



Bedeutung von Interleukin-10 für die Funktionalität von NK-Zellen und ihre Wechselwirkung mit umgebenden Immunzellen

vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat)

Dissertation

von Anja Waldmann

aus Schwerin

Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bodo Laube

Darmstadt 2019

Waldmann, Anja: Bedeutung von Interleukin-10 für die Funktionalität von NK-Zellen
und ihre Wechselwirkung mit umgebenden Immunzellen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2019

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-81823

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2018

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

[*https://creativecommons.org/licenses/*](https://creativecommons.org/licenses/)

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den.....

(Unterschrift)

Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) repräsentieren einen wichtigen Effektorzelltyp in der adoptiven Krebs-Immuntherapie, da sie imstande sind, maligne Zellen direkt zu eliminieren und die Tumor-spezifische adaptive Immunantwort zu regulieren. Als allogenes Zelltherapeutikum kommt in experimentellen Ansätzen neben primären Spender-NK-Zellen auch die humane NK-Zelllinie NK-92 zum Einsatz. NK-92 Zellen können *in vitro* unter GMP-Bedingungen gut expandiert und genetisch modifiziert werden. Da die natürliche Zytotoxizität dieser Zellen gegenüber Krebszellen von soliden Tumoren begrenzt ist, wurden NK-92 Zellen mit chimären Antigenrezeptoren (CARs) ausgestattet, wodurch sie definierte Antigene auf der Oberfläche von Tumorzellen erkennen und Antigen-positive Zellen effizient abtöten können. Eine in dieser Arbeitsgruppe generierte CAR NK-92 Zelllinie ist NK-92/5.28.z, welche gegen das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 gerichtet ist und in präklinischen Tierexperimenten zur Abstoßung ErbB2-exprimierender Tumoren führte. Außerdem induzierte die Behandlung mit NK-92/5.28.z Zellen in immunkompetenten Mäusen einen immunologischen Langzeitschutz gegen das Auswachsen erneut injizierter Tumorzellen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Beeinflussung der Aktivität von endogenen Immunzellen in der Tumor-Mikroumgebung durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch aktivierte NK-Zellen. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass CAR NK-92 Zellen nach Kontakt mit Antigen-positiven Tumorzellen große Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ sekretieren. Interessanterweise sezernieren aktivierte CAR NK-92 Zellen jedoch auch das immunregulatorische Zytokin Interleukin (IL)-10. Hierbei handelt es sich um ein Zytokin mit pleiotropen Effekten, das von diversen Immunzellen ausgeschüttet wird. Grundsätzlich kann IL-10 pro-inflammatorischen Zytokinen entgegenwirken und die endogene Anti-Tumor-Antwort dämpfen. Allerdings ist IL-10 auch in der Lage, die Zytotoxizität von T-Zellen und NK-Zellen zu steigern. So ist in der derzeitigen Literatur die Bedeutung des von NK-Zellen sekretierten IL-10 für NK-Zellen selbst und für umgebende Immunzellen nicht eindeutig geklärt. Daher war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von IL-10 auf das Wachstum und die Funktion von NK-Zellen und auf deren Interaktion mit anderen Immunzellen besser zu verstehen. Im Fokus der Untersuchungen standen die kontinuierlich expandierbare NK-Zelllinie NK-92 sowie die davon abgeleitete CAR-Effektorzelllinie NK-92/5.28.z als klinisch relevante Modelle für die adoptive Immuntherapie. Nach Aktivierung von parentalen und ErbB2-spezifischen NK-92 Zellen zeigte sich eine erhöhte IL-10 Expression auf mRNA- und Protein-Ebene, was frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe bestätigte. Zudem wurde die Expression des Rezeptors IL-10R α auf NK-92 Zellen und CAR NK-92/5.28.z Zellen nachgewiesen, sodass endogen produziertes IL-10 autokrin auf die Zellen zurückwirken kann. Im Folgenden wurden Ansätze zur Hemmung der Produktion und biologischen Aktivität des von NK-92 Zellen sekretierten IL-10 untersucht. So wurde ein rekombinanter anti-IL-10 Mini-Antikörper mit vier Bindestellen generiert, der die

Aktivität von löslichem IL-10 neutralisierte. Zudem wurden Ansätze erprobt, die die IL-10 Expression oder Sekretion in NK-92 Zellen unterbinden. Dazu zählten die shRNA-vermittelte Herunterregulation der IL-10 Expression auf mRNA-Ebene, ein CRISPR/Cas9-vermittelter IL-10 Gen-*knockout* auf DNA-Ebene und schlussendlich eine Hemmung der IL-10 Sekretion auf Protein-Ebene mittels intrazellulär exprimierter anti-IL-10 scFv-Antikörper (Intrabodies). Hierzu wurden scFv-Antikörpermoleküle konstruiert, die in den extrazellulären Raum sekretiert werden (α IL-10S), auf der Zelloberfläche lokalisiert sind (α IL-10TM) oder durch eine zusätzliche KDEL-Sequenz am C-Terminus im Lumen des endoplasmatischen Retikulums zurückgehalten werden, um dadurch die Sekretion von IL-10 zu unterdrücken (α IL-10ER). Die untersuchten Strategien zeigten sich alle in NK-92 Zellen funktional, führten jedoch zu einer im Ausmaß unterschiedlichen Reduktion der IL-10 Expression. In Bezug auf die Reduktion der IL-10 Sekretion erwiesen sich insbesondere die Gen-Editierung mit CRISPR/Cas9 und die Expression von α IL-10ER Intrabodies als gleichermaßen hoch effektiv. Es zeigte sich, dass eine reduzierte IL-10 Expression oder Sekretion die Proliferation, die natürliche und CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität der NK-Zellen und die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und MIP-1 α nicht beeinflusste. Ein für die Funktionalität von NK-92 Zellen entscheidender Beitrag von endogen produziertem IL-10 kann daher ausgeschlossen werden. Allerdings bewirkte die Verminderung oder vollständige Eliminierung der IL-10 Expression in NK-92/5.28.z Zellen je nach gewähltem Ansatz eine unterschiedliche Erhöhung der TNF- α Sekretion. Um zu untersuchen, ob das von aktivierten CAR NK-92 Zellen sezernierte IL-10 einen Einfluss auf den Phänotyp umgebender Antigen-präsentierender Zellen hat, wurden Transwell-Experimente mit Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen und Makrophagen durchgeführt. Die löslichen Faktoren aktivierter NK-92/5.28.z Zellen leiteten dabei die Reifung dendritischer Zellen ein, wobei dieser Prozess durch eine IL-10 Depletion in CAR NK-92 Zellen weiter gefördert wurde. Ohne Beeinflussung der IL-10 Produktion induzierten die sekretierten Botenstoffe aktivierter NK-92/5.28.z Zellen die Polarisierung von Makrophagen hin zu einem M2-Phänotyp, welcher in der Tumprogression involviert ist. Wurde die Aktivität des von aktivierten NK-92/5.28.z Zellen sekretierten IL-10 dagegen neutralisiert oder seine Sekretion unterbunden, begünstigte dies die Ausprägung eines M1-ähnlichen Phänotyps. Diese Makrophagen-Population weist in der Regel antitumorale Eigenschaften auf. Entsprechend könnten diese Effekte die therapeutische Wirkung IL-10-depletierter NK-92/5.28.z Zellen *in vivo* durch eine verbesserte Aktivierung endogener Immunzellen steigern. Um die Anti-Tumor-Aktivität IL-10-depletierter NK-92/5.28.z Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein immun-kompetentes Mausmodell mit ErbB2-überexprimierenden B16-F10 Melanomzellen in C57BL/6N Albino Mäusen etabliert. Die Behandlung subkutan verabreichter B16-F10/ErbB2 Tumorzellen mit unmodifizierten oder IL-10-depletierten NK-92/5.28.z Zellen verlängerte dabei das Überleben der Mäuse im Vergleich zu Kontroll-Tieren, die mit parentalen NK-92 Zellen

oder Puffer behandelt wurden. Allerdings wurde keine Langzeit-Regression der Tumoren der behandelten Tiere durch die Injektion von CAR NK-92 Zellen erzielt. Zudem waren die Überlebenskurven der mit unmodifizierten oder IL-10-depletierten NK-92/5.28.z Zellen therapierten Behandlungsgruppen nicht signifikant verschieden. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Langzeiteffekt der Behandlung könnte sein, dass B16-F10/ErbB2 Zellen nur sehr geringe Mengen an MHC-Klasse I exprimieren und damit einem Angriff zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen entgehen können. Wie in einem unabhängigen *in vitro* Versuch gezeigt wurde, induziert zwar murines IFN- γ , nicht aber das von NK-92 Zellen sezernierte humane IFN- γ die Expression von MHC-Klasse I auf B16-F10/ErbB2 Zellen. Entsprechend ist davon auszugehen, dass das humane IFN- γ auch *in vivo* keinen Einfluss auf die murinen Tumor- und Immunzellen ausübt. So könnte aufgrund der fehlenden Aktivität des ausgeschütteten humanen IFN- γ die Hemmung der IL-10 Sekretion in NK-92/5.28.z Zellen keinen entscheidenden Beitrag zur Induktion einer anhaltenden endogenen Anti-Tumor-Immunantwort leisten. Die im Tiermodell erhaltenen Daten verdeutlichen jedoch, dass die Hemmung der IL-10 Sekretion in NK-92/5.28.z Zellen zumindest keinen negativen Einfluss auf den Therapieerfolg hatte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Hemmung der IL-10 Expression in NK-92 Zellen oder die Neutralisierung der IL-10 Aktivität die wesentlichen Funktionen dieser NK-Zellen nicht beeinträchtigt, aber den Phänotyp umgebender Immunzellen in Richtung einer verbesserten antitumoralen Aktivität beeinflussen kann. Ob dies auch eine Steigerung der Anti-Tumor-Immunantwort im Kontext eines lebenden Organismus bedingt, muss in weiterführenden *in vivo* Studien untersucht werden.

Inhaltsverzeichnis

Ehrenwörtliche Erklärung	I
Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Krebsentstehung und -Immuneditierung	1
1.2 Chimäre Antigenrezeptoren in der adoptiven Immuntherapie	3
1.3 Natürliche Killerzellen	8
1.3.1 Funktion	8
1.3.2 Erkennung von Zielzellen und Zytotoxizitätsmechanismen	9
1.3.3 Modulation der angeborenen und adaptiven Anti-Tumor-Immunität durch NK-Zellen	11
1.4 Zelluläre Immuntherapie mit NK-Zellen	13
1.4.1 Die NK-Zelllinie NK-92 als allogenes Zelltherapeutikum	15
1.4.2 Die zielgerichtete NK-92 Zelllinie NK-92/5.28.z	16
1.5 Rolle des Zytokins Interleukin-10 im Immunsystem	18
1.5.1 Expression von IL-10	18
1.5.2 IL-10-vermittelte Signaltransduktion	19
1.5.3 Biologische Wirkung von IL-10 auf Zellen des Immunsystems	20
1.5.4 Pleiotrope Effekte von IL-10 in präklinischen Tumormodellen	24
1.6 Ziel dieser Arbeit	25
2 Material	27
2.1 Laborgeräte und Apparaturen	27
2.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.3 Chemikalien und Reagenzien	29
2.4 Puffer und Lösungen	29
2.5 Rekombinante Proteine	30
2.6 Antikörper	31
2.7 Plasmide	33
2.8 Oligonukleotide	35
2.9 Bakterienstämme	36
2.10 Bakterienmedien und Antibiotika	37
2.11 Zellkulturmedien und Zusätze	37
2.12 Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen	38
2.13 Mausstamm	41
3 Methoden	42
3.1 Molekularbiologische Methoden	42
3.1.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	42
3.1.2 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion	43
3.1.3 Quantitative Echtzeit-PCR	44
3.1.4 Restriktion von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA	45
3.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA	45
3.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
3.1.7 DNA-Ligation	46
3.1.8 Transformation von DNA in chemokompetente <i>E. coli</i>	46
3.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	47
3.1.10 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentration	47
3.1.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA	47
3.2 Zellbiologische und immunologische Methoden	48
	V

3.2.1	Kultivierung von Säugerzellen	48
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl	48
3.2.3	Kryokonservierung von Säugerzellen	48
3.2.4	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	49
3.2.5	Generierung von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen	50
3.2.6	Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen	49
3.2.7	Transwell-Experimente mit Immunzellen	50
3.2.8	Generierung lentiviraler Vektorpartikel in HEK293T Zellen	51
3.2.9	Bestimmung des Vektortiters	51
3.2.10	Lentivirale Transduktion von NK-92 Zellen	52
3.2.11	Durchflusszytometrische Analysen	52
3.2.12	Fluoreszenz-basierte Zellsortierung	53
3.2.13	Zytotoxizitätsassay	54
3.2.14	Proliferationsassay	55
3.2.15	Stimulierung von NK-92 Zellen	55
3.2.16	Stimulierung von B16-F10/ErbB2 Zellen mit IFN- γ	57
3.2.17	Analyse der Zytokin-Sekretion	57
3.3	Proteinbiochemische Methoden	58
3.3.1	ELISA	58
3.3.2	Herstellung von Zelllysaten	59
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	59
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
3.3.5	Immunoblot	61
3.4	Experimente mit Mäusen	62
3.4.1	Haltung von immunkompetenten Mäusen	62
3.4.2	Induktion und Behandlung syngener B16-F10/ErbB2 Tumoren	62
3.5	Statistische Analysen	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Expression von IL-10 und IL-10R α in NK-92 Zellen	64
4.1.1	Expression von IL-10	64
4.1.2	Expression von IL-10R α	66
4.1.3	Zusammenfassung der Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2	67
4.2	Inhibierung der IL-10 Aktivität durch einen tetravalenten, antagonistischen anti-IL-10 Mini-Antikörper	68
4.2.1	Generierung und funktionelle Charakterisierung des anti-IL-10 Mini-Antikörpers	68
4.2.2	Einfluss des anti-IL-10 Mini-Antikörpers auf die zytotoxische Aktivität von NK-92 Zellen	71
4.2.3	Zusammenfassung der Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2	73
4.3	Hemmung der IL-10 Expression in NK-92 Zellen	73
4.3.1	RNAi-vermitteltes <i>silencing</i> der IL-10 mRNA durch das Einbringen einer spezifischen shRNA	73
4.3.2	Abschalten des IL-10 Gens durch Gen-Editierung mit CRISPR/Cas9	77
4.3.3	Hemmung der IL-10 Sekretion durch intrazelluläre Expression IL-10-neutralisierender scFv-Antikörper	81
4.3.4	Zusammenfassung der Abschnitte 4.3.1 bis 4.3.3	88
4.4	Einfluss der IL-10 Depletion auf die Funktionalität von NK-92 Zellen <i>in vitro</i>	89
4.4.1	Lebensfähigkeit und Wachstum von NK-92 Zellen mit blockierter IL-10 Expression oder Sekretion	89
4.4.2	Natürliche und CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität IL-10-depletierter NK-92 Zellen	92
4.4.3	Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch IL-10-depletierte NK-92 Zellen	96
4.4.4	Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1 bis 4.4.3	103
4.5	Einfluss der IL-10 Depletion in NK-92 Zellen auf ko-kultivierte Immunzellen	104

4.5.1	Expression Reifungs-assoziiertes-Oberflächenmarker von dendritischen Zellen in Gegenwart von α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen	105
4.5.2	Polarisierung von Makrophagen in Anwesenheit von NK-92/5.28.z und anti-IL-10 Mini-Antikörper	110
4.5.3	Polarisierung von Makrophagen in Anwesenheit von α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen	115
4.5.4	Zusammenfassung der Abschnitte 4.5.1 bis 4.5.3	119
4.6	<i>In vivo</i> Anti-Tumor-Aktivität α IL-10ER-exprimierender NK-92/5.28.z Zellen in einem immunkompetenten Mausmodell	119
5	Diskussion	126
5.1	Expression von IL-10 und IL-10R in parentalen und ErbB2-spezifischen NK-92 Zellen	127
5.2	Hemmung der Aktivität von IL-10 durch einen rekombinanten anti-IL-10 Mini-Antikörper	129
5.3	Hemmung der endogenen IL-10 Expression durch genetische Modifikation von NK-92 Zellen	130
5.4	Proliferation und Anti-Tumor-Aktivität IL-10-depletierter NK-92 Zellen <i>in vitro</i>	134
5.5	Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine nach Depletion von IL-10 in NK-92 Zellen	136
5.6	Bewertung der untersuchten Strategien zur IL-10 Depletion	138
5.7	Einfluss IL-10-depletierter NK-92/5.28.z Zellen auf die Reifung dendritischer Zellen	139
5.8	Einfluss der Hemmung von IL-10 in NK-92/5.28.z Zellen auf die Polarisation von Makrophagen	141
5.9	Analyse der Anti-Tumor-Aktivität von α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen <i>in vivo</i>	144
5.10	Modulation der Tumor-Mikroumgebung zur Verbesserung des Erfolgs der adoptiven Immuntherapie	145
5.11	Ausblick	147
6	Literaturverzeichnis	149
7	Abkürzungsverzeichnis	170
	Publikationen	172
	Danksagung	174
	Lebenslauf	175

1 Einleitung

1.1 Krebsentstehung und -Immuneditierung

Nach wie vor sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Zwar gibt es unzählige Arten von Krebs, allerdings treten nur einige wenige oft auf. So ist beispielsweise bei Männern der Lungenkrebs und bei Frauen der Brustkrebs die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2017). Krebs wird als ein maligner (bösartiger) Tumor definiert, welcher in der Lage ist, in das angrenzende, gesunde Gewebe einzudringen und sich über die Blutbahn und Gewebsflüssigkeit (Lymphe) im Körper auszubreiten. Weitere Kennzeichen für maligne Tumoren sind eine hohe Rückfallrate und schlechte Therapierbarkeit. Im Gegensatz hierzu sind benigne (gutartige) Tumoren nicht infiltrierend, vom umliegenden Gewebe abgrenzbar, nicht metastasierend und gut therapierbar (Ruddon, 2007). Die Entstehung von malignen Tumoren ist ein mehrstufiger Prozess, der als Karzinogenese bezeichnet wird und die Akkumulation mehrerer genomischer Veränderungen erfordert (Foulds, 1954; Hanahan and Weinberg, 2000). Diese können durch karzinogene Substanzen, onkogene Viren, erbliche Faktoren oder ionisierende Strahlung induziert werden (Anand et al., 2008). Der Grund für die neoplastische Transformation liegt in der Veränderung des Expressionsmusters verschiedenster Gene. Hierbei ist zum einen der Funktionsverlust (*loss of function*) von Tumorsuppressorgenen oder deren transkriptionelle Herunterregulation durch epigenetische Mechanismen zu nennen. Zum anderen kann eine Deletion, Translokation oder eine Punktmutation zum Funktionsgewinn (*gain of function*) oder zu einer Überexpression von Protoonkogenen führen (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Hanahan und Weinberg (2000) definierten ursprünglich sechs Merkmale, welche eine neoplastisch veränderte Tumorzelle von einer normalen Zelle unterscheiden. Diese Eigenschaften umfassen (I) das Potential zum unbegrenzten Wachstum, (II) die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, (III) die Unempfindlichkeit gegenüber externen Signalen, die das Wachstum hemmen und den Zelltod bewirken, (IV) die verminderte Neigung zum programmierten Zelltod (Apoptose), (V) die Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und (VI) das invasive Wachstum bzw. die Metastasenbildung. Neben diesen vor fast 20 Jahren beschriebenen Merkmalen wurden 2011 ein erhöhter Energiestoffwechsel, tumorfördernde Entzündungsprozesse und die Fähigkeit, den Angriffen des körpereigenen Immunsystems zu entgehen, als weitere Eigenschaften definiert (Hanahan and Weinberg, 2011).

Dass entartete Körperzellen als solche von den Zellen des Immunsystems erkannt und eliminiert werden können (Immun-Überwachung, *immune surveillance*), wurde bereits im Jahr 1909 von dem Immunologen Paul Ehrlich als Vermutung geäußert und in den Jahren 1957 und 1994 als die Reaktion des „Selbst gegen verändertes Selbst“ beschrieben (Burnet, 1957; Ehrlich, 1909; Houghton, 1994). So zeichnen sich Tumorzellen durch ein verändertes Proteinexpressionsprofil aus (Beckhove et al., 2004; Disis et al., 2000). Die Ansammlung von

Mutationen kann zur Expression neuer, körperfremder Proteine, welche als Tumor-spezifische Antigene (TSA) bzw. Neoantigene bezeichnet werden, führen. Daneben können Tumoren sogenannte Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) exprimieren. Hierbei handelt es sich um Proteine, die ubiquitär, gewebsspezifisch oder in bestimmten Differenzierungsstadien auf gesunden Körperzellen zu finden sind. Im Tumorgewebe werden diese allerdings überexprimiert (Morris et al., 2003; Rosenberg, 1999). Die TSAs und TAAs werden innerhalb der Tumorzellen prozessiert, wobei die dabei entstehenden Peptide an den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC, beim Menschen als *human leukocyte antigen*, HLA bezeichnet)-Klasse I binden und durch diesen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dort werden die Peptide von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) über rekombinationsabhängige, klonal exprimierte T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptors*, TCR), sowie den Korezeptor CD8 erkannt, was eine Immunantwort auslösen kann (Zinkernagel and Doherty, 1979). Trotz der vielseitigen Fähigkeiten des Immunsystems ist die Entwicklung eines Tumors nie auszuschließen, sodass sich die Immun-Überwachung als ein Teil eines Prozesses definiert, der als Immuneditierung (*immunoediting*) bezeichnet wird (Dunn et al., 2006; Shankaran et al., 2001). Es wurde postuliert, dass das Immunsystem den Körper nicht nur vor einer Tumorentwicklung schützt, sondern auch die Eigenschaften von Krebszellen beeinflussen kann (Dunn et al., 2002). So wurde in Tierversuchen gezeigt, dass immundefiziente Mäuse schneller spontane oder durch karzinogene Substanzen induzierte Tumoren entwickelten, als immunkompetente Tiere (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2006). Auffällig war hierbei, dass sich die Tumoren in den beiden Gruppen hinsichtlich ihrer immunogenen Eigenschaften unterschieden (Dunn et al., 2005; O'Sullivan et al., 2012). Die Immuneditierung gliedert sich in drei Phasen. Die erste Phase umfasst die Eliminierung entarteter Körperzellen durch Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems und entspricht den Vorstellungen der Immun-Überwachung. So werden Tumorzellen nicht nur durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, sondern auch durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) lysiert. Zudem wird die Anti-Tumor-Antwort durch die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und anderen Effektormolekülen aktivierter Immunzellen gesteigert (Diamond et al., 2011; Dunn et al., 2006; Fuertes et al., 2011). Wenn nicht alle Tumorzellen eliminiert werden können, schließt sich die zweite Phase dieses Modells an, das Equilibrium (die Gleichgewichtsphase). Hierbei verhindert das Immunsystem die Ausbreitung des Tumors, indem das Wachstum der Tumorzellen gestoppt und einzelne Zellen abgetötet werden. Es wurde gezeigt, dass vor allem T-Zellen, Interleukin (IL)-12 und IFN (Interferon)- γ für die Aufrechterhaltung dieses Zustandes benötigt werden (Schreiber et al., 2011). Allerdings übt das Immunsystem damit einen Selektionsdruck auf den Tumor aus, was dazu führen kann, dass sich Tumorzellvarianten durchsetzen, die der Erkennung durch das Immunsystem entkommen. Man spricht hierbei von der *Escape*-Phase (Entkommens-Phase) (Dunn et al.,

2006). Die Mechanismen dahinter sind sehr vielfältig und umfassen beispielsweise das Herunterregulieren oder das Fehlen von Tumorantigenen oder MHC-Klasse I Molekülen und kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche der Krebszellen (Chang and Ferrone, 2007; Mittal et al., 2014). Tumorzellen entgehen der Lyse durch NK-Zellen, indem sie die Expression von Liganden für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren herunter- und die Expression von Liganden für inhibierende Rezeptoren heraufregulieren (Ljunggren and Malmberg, 2007). Zudem können sich entartete Zellen einen Wachstumsvorteil durch die erhöhte Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl2 verschaffen. Einen weiteren Mechanismus stellt die Induktion einer immunsupprimierenden Mikroumgebung dar, die durch die Sekretion von Zytokinen, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und TGF- β (*transforming growth factor beta*), sowie die Expression immunregulatorischer Moleküle, wie PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), geschaffen wird (Mittal et al., 2014).

Um die Tumorzellen in dieser Phase dennoch eliminieren zu können, wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Ansätzen verfolgt, die das Patienten-eigene Immunsystem im Kampf gegen den Krebs unterstützen. Diese immuntherapeutischen Strategien zur Behandlung von Tumorerkrankungen umfassen u.a. die Verabreichung von monoklonalen Antikörpern wie Ipilimumab (anti-CTLA-4) oder Nivolumab (anti-PD-1) zur Blockade von Immun-*Checkpoints*, die Verabreichung von rekombinanten Proteinen wie IL-2 zur Stimulierung des Immunsystems, die Vakzinierung mit Tumor-assoziierten Antigenen oder den adoptiven Transfer von *ex vivo* aktivierten T- und NK-Zellen (Farkona et al., 2016). Um das therapeutische Potential von Lymphozyten zu erhöhen, wurde zudem eine Form des adoptiven Zell-Transfers entwickelt, die die Ausstattung der Zellen mit chimären Antigenrezeptoren (*chimeric antigen receptors*, CARs) vorsieht.

1.2 Chimäre Antigenrezeptoren in der adoptiven Immuntherapie

Die zelluläre Immuntherapie mit CAR-exprimierenden Lymphozyten hat in den letzten Jahren in mehreren Studien erfolversprechende Ergebnisse hervorgebracht. Vor allem 2017 war ein bedeutsames Jahr, da die ersten zwei anti-CD19 CAR-T-Zell-Therapien in den USA gegen rezidierte oder Therapie-refraktäre akute lymphatische Leukämie (ALL) und bestimmte Formen des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) bei Kindern und jungen Erwachsenen zugelassen wurden (Yip and Webster, 2018).

Chimäre Antigenrezeptoren wurden vor mehr als 25 Jahren als synthetische T-Zell-aktivierende Rezeptoren beschrieben, die den Vorteil besitzen, Tumor-assoziierte Antigene unabhängig von der MHC-restringierten Antigen-Präsentation zu erkennen (Eshhar et al., 1993; Gross et al., 1989). Dadurch werden auch Tumorzellen lysiert, die der Erkennung durch das Immunsystem über eine Herunterregulation der MHC-Klasse I Moleküle oder über eine veränderte Antigen-Prozessierung entkommen sind (Vitale et al., 2005b; Wucherpfennig et al.,

2010). CARs bestehen aus einer extrazellulären Antigen-Bindedomäne, welche über eine extrazelluläre Gelenkregion mit einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Signaldomäne verbunden ist. Die Antigen-Bindestelle ist von den variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten (V_L) Ketten monoklonaler Antikörper abgeleitet, welche über eine Linkersequenz zu einer Polypeptidkette fusioniert sind (*single chain variable fragment*, scFv) (Winter and Milstein, 1991). Über diesen Antikörperanteil können CARs nicht nur Proteine, sondern auch Kohlenhydrat- und Glykolipidstrukturen erkennen (Hombach et al., 1997; Rossig et al., 2001). Um die Flexibilität der Antigen-Bindedomäne zu gewährleisten, ist diese an eine kurze Gelenkregion (*hinge*) gebunden, die meist von CD8 oder IgG1 abgeleitet ist (Bridgeman et al., 2010; Eshhar et al., 2001). So wurde für ErbB2-spezifische CARs gezeigt, dass die Verwendung einer Gelenkregion eine gewisse Distanz zwischen Antigen-Bindedomäne und der Plasmamembran aufrechterhält, was unerlässlich für das Binden des Antigens ist (Moritz and Groner, 1995). Weiterhin beeinflussen Länge und Art der Gelenkregion die Funktion des CAR-Moleküls (Hudecek et al., 2013; Patel et al., 1999). Der Gelenkregion folgt die Transmembrandomäne, die meist von den T-Zell-Molekülen CD3 ζ , CD4, CD8 bzw. CD28 abgeleitet ist (Fitzer-Attas et al., 1998; Hombach et al., 2000; Hombach et al., 2001; Kahlon et al., 2004). Vorzugsweise wird die Transmembrandomäne von CD28 verwendet, da solche CAR-Moleküle eine längere Halbwertszeit und eine höhere Expression aufweisen als z.B. CAR-Moleküle, die die Transmembrandomäne von CD3 ζ besitzen (Pule et al., 2005). Als intrazelluläre Signaldomäne wird entweder die CD3 ζ Kette aus dem T-Zell-Rezeptor Komplex oder die aus Mastzellen stammende Fc ϵ RI γ Kette eingesetzt (Eshhar, 1997; Haynes et al., 2001). Der bis hierhin beschriebene Aufbau eines CAR-Moleküls wird als CAR der 1. Generation bezeichnet (Abb. 1.1) und ermöglicht die spezifische Lyse von Tumorzellen durch genmodifizierte T-Zellen *in vitro* und *in vivo*.

Um die Anti-Tumor-Aktivität von CAR-exprimierenden Lymphozyten zu verbessern und zugleich deren Persistenz *in vivo* zu erhöhen, wurde eine zusätzliche intrazelluläre kostimulatorische Domäne, wie z.B. CD28, ICOS (*inducible costimulator domain*), OX40 (CD134), 4-1BB (CD137) oder CD244, in das CAR-Molekül eingebaut (Altvater et al., 2009; Finney et al., 2004; Kowolik et al., 2006). Die zusätzliche Domäne steigert die Zytotoxizität, Proliferation und die Zytokin-Produktion (IFN- γ , IL-2) von CAR-T-Zellen *in vitro* und *in vivo* im Vergleich zu CAR-T-Zellen, die einen CAR der 1. Generation exprimieren. CAR-Moleküle mit einer zusätzlichen kostimulatorischen Domäne werden als CARs der 2. Generation (Abb. 1.1) und mit zwei kostimulatorischen Domänen als CARs der 3. Generation definiert (Carpenito et al., 2009; Zhong et al., 2010). Bislang ist noch nicht geklärt, welche der kostimulatorischen Domänen vorzugsweise zu verwenden ist. Beispielsweise erhöht 4-1BB als kostimulatorische Domäne die *in vivo* Persistenz der zielgerichteten CAR-T-Zellen im Vergleich zu CD28 (Long et al., 2015; Zhao et al., 2015). CAR-T-Zellen, die als zusätzliche Domäne ICOS exprimieren,

induzieren die Bildung von Th17 ähnlichen Effektor-T-Zellen, was zu einer gesteigerten Anti-Tumor-Antwort im Mausmodell führte (Guedan et al., 2014). CARs der 3. Generation besitzen eine noch höhere Effizienz als CARs der 2. Generation, allerdings begünstigt die Verwendung von zwei kostimulatorischen Domänen eine Hyperstimulation und den Aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) der CAR-T-Zellen (Hombach et al., 2013).

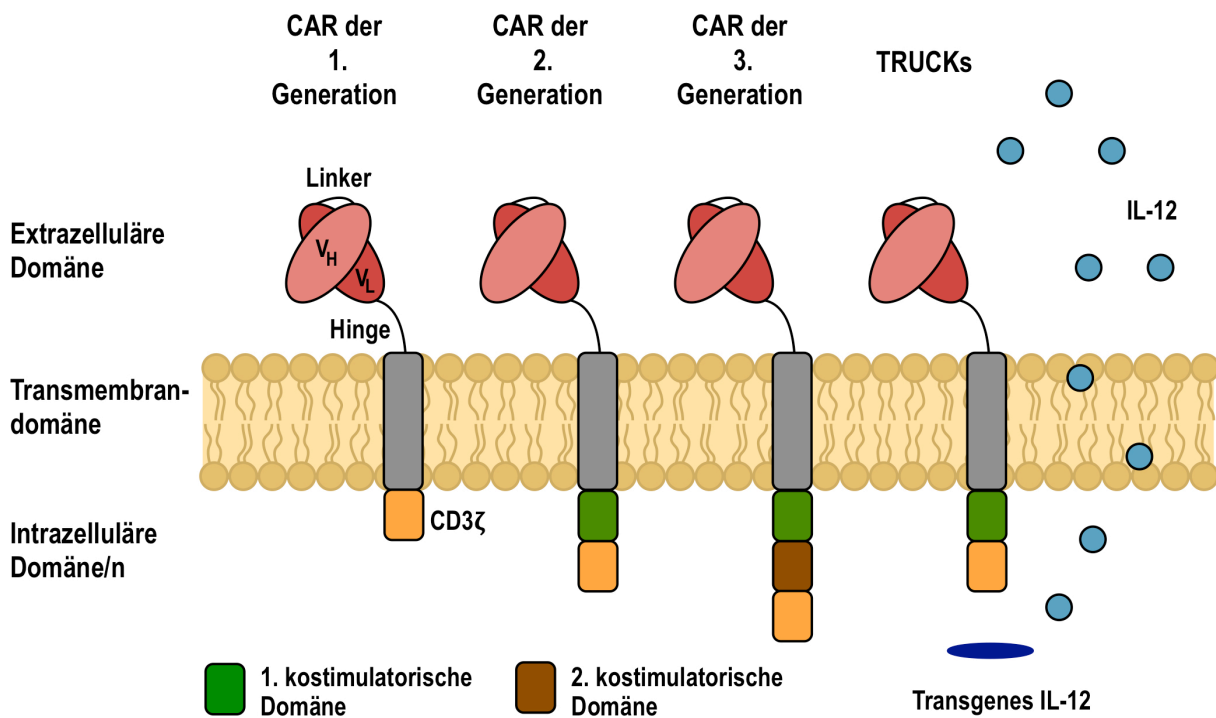


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus von chimären Antigenrezeptoren der ersten, zweiten und dritten Generation und des Konzepts von TRUCKs. Die extrazelluläre Domäne von CARs besteht aus einem Antigen-spezifischen scFv-Antikörperfragment. Hierbei sind die variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) eines Antikörpers über eine Linkersequenz miteinander fusioniert. Bei CARs der 1. Generation ist das scFv-Antikörperfragment über eine Gelenkregion (*hinge*) nur mit der CD3 ζ Kette aus dem T-Zell-Rezeptor Komplex verbunden. CARs der 2. Generation tragen neben der Transmembran- und Signaldomäne eine zusätzliche kostimulatorische Domäne, wie CD28 oder 4-1BB, um die Aktivierung der Effektorzellen und zugleich deren Persistenz *in vivo* zu erhöhen. Diesbezüglich besitzen CARs der 3. Generation durch das Einfügen von zwei kostimulatorischen Domänen eine noch höhere Effizienz. Der Aufbau von TRUCKs (*T cell redirected for universal cytokine-mediated killing*) entspricht dem der CARs der 2. Generation. Allerdings zeichnen sich TRUCKs dadurch aus, dass die Aktivierung der T-Zelle durch den CAR die Transkription von transgenen Produkten initiiert. Ein Beispiel ist die Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12, dessen Transkription nach CAR-vermittelter Aktivierung über ein zusätzliches, NFAT-reguliertes Genkonstrukt in den CAR-T-Zellen induziert wird. Dadurch ist es möglich, über das sekretierte IL-12 einen Einfluss auf benachbarte Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen und Makrophagen auszuüben und die Anti-Tumor-Antwort zu steigern.

Die beschriebene CAR-Technologie wurde bereits erfolgreich in klinischen Studien gegen diverse Tumorentitäten eingesetzt. Für diese Art der Therapie werden dem Patienten körpereigene (autologe) T-Zellen entnommen, die mittels Transduktion mit viralen Vektoren oder mittels Elektroporation mit Plasmid-DNA mit CAR-Molekülen ausgestattet werden (Levine

et al., 2017). Anschließend werden die CAR-T-Zellen wieder zurück in den Körper transfundiert. Vor allem die Behandlung hämatologischer Krebserkrankungen, wie der ALL, der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL), dem Non-Hodgkin-Lymphom und dem Hodgkin-Lymphom, mit tumorspezifischen CAR-T-Zellen verzeichnete vielversprechende Resultate (Davila et al., 2014; Kalos et al., 2011; Turtle et al., 2016b; Wang et al., 2017). Dabei führte der Einsatz von CAR-T-Zellen gerichtet gegen das B-Zell-Antigen CD19 in Patienten mit ALL und CML zu einer partiellen Tumorremission oder zu einer kompletten Abstoßung des Tumors (Kalos et al., 2011; Maude et al., 2014; Porter et al., 2011; Turtle et al., 2016a). Im August 2017 ließ die US-Arzneimittelbehörde FDA eine erste anti-CD19 CAR-T-Zelltherapie unter dem Handelsnamen Kymriah für die Behandlung von rezidivierter oder Therapie-refraktärer ALL zu (Yip and Webster, 2018). In der vorangegangenen ELIANA-Studie konnte eine vollständige Remission des Tumors innerhalb von drei Monaten in 83% der Patienten erreicht werden. Im Oktober 2017 erhielt eine zweite anti-CD19 CAR-T-Zelltherapie mit dem Handelsnamen Yescarta die Zulassung für den amerikanischen Markt. So darf Yescarta zur Behandlung von bestimmten Formen des Non-Hodgkin-Lymphoms angewendet werden, sofern die Patienten zuvor auf andere Behandlungsmöglichkeiten nicht angesprochen haben. Die Zulassung stützte sich auf die Ergebnisse der klinischen Phase-II-Studie ZUMA-1, bei der in 58% der behandelten Patienten eine komplette Abstoßung des Tumors erzielt wurde. Beide Zelltherapeutika sind mit CARs der 2. Generation ausgestattet, die einen anti-CD19 scFv-Antikörper und die CD3 ζ -Kette für die Signalweiterleitung tragen (D'Aloia et al., 2018). Die CAR Moleküle unterscheiden sich allerdings in der verwendeten kostimulatorischen Domäne (Kymriah: 4-1BB, Yescarta: CD28). Neben hämatologischen Erkrankungen wurden CAR-T-Zellen auch gegen solide Tumoren eingesetzt. So konnten GD2-spezifische CAR-T-Zellen in drei Patienten mit Neuroblastom eine komplette Remission des Tumors induzieren (Louis et al., 2011; Pule et al., 2008). Die Infusion ErbB2-spezifischer CAR-T-Zellen in Patienten mit fortschreitendem Glioblastom wurde als sicher eingestuft. (Ahmed et al., 2017). Hierbei wurde bei einem Patienten ein partielles Ansprechen und bei sieben Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung von bis zu 29 Monaten erreicht. Gegen die selbe Tumorentität wurden auch IL-13R α 2- sowie EGFRvIII-spezifische CAR-T-Zellen getestet (Brown et al., 2016; O'Rourke et al., 2017). Dabei wurde bei einem Patienten eine komplette Remission des Tumors durch die Behandlung mit IL-13R α 2-spezifischen CAR-T-Zellen erzielt. Das Verabreichen von EGFRvIII-spezifischen CAR-T-Zellen führte hingegen nur zu einer Stabilisierung der Erkrankung, die bei einem Patienten beobachtet wurde.

Damit zeigt sich, dass der bisher beschriebene CAR-Ansatz vor allem bei der Behandlung von soliden Tumoren noch große Limitationen aufweist. So kann es aufgrund der Heterogenität des Tumors, der Herunterregulation oder Mutation von Zielantigenen, wie auch durch die immunsupprimierende Mikroumgebung trotz Immuntherapie zur Progression oder zum

Wiederauftreten des Tumors (Tumorrezidiv) kommen. Um dem entgegen zu wirken, wurden, basierend auf der gängigen CAR-Technologie, neue Strategien entwickelt. Ein Ansatz beschreibt TRUCKs (*T cell redirected for universal cytokine-mediated killing*), die in der Lage sind, die Mikroumgebung des Tumors zu beeinflussen (Abb. 1.1). Dabei wird nach der CAR-vermittelten Aktivierung über ein zusätzliches Genkonstrukt in den CAR-T-Zellen die Transkription des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 über einen NFAT-abhängigen minimalen IL-2 Promotor initiiert (Chmielewski et al., 2011; Pegram et al., 2012). IL-12 steigert die Anti-Tumor-Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen, und beeinflusst die Makrophagen-Funktion. Eine weitere Möglichkeit die therapeutische Wirksamkeit von CAR-Lymphozyten zu verbessern, sind bispezifische CARs, auch bekannt als TanCARs, die zwei Antigen-Bindedomänen in einem transgenen Rezeptor tragen. Beispielsweise wurden TanCAR-exprimierende T-Zellen entwickelt, die die Tumorantigene ErbB2 und CD19 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gleichzeitig erkennen können (Grada et al., 2013). Gleiches wurde für TanCAR-exprimierende T-Zellen beobachtet, die gegen ErbB2 und IL-13R α auf Glioblastom-Zellen gerichtet waren und im Mausmodell zu einem verlängerten Überleben führten (Hegde M, 2016).

Dennoch beschränkt sich die konventionelle CAR-Technologie auf die Erkennung von ein bis zwei Tumorantigenen. Der dadurch geschaffene Selektionsdruck begünstigt das Auswachsen von Tumorzellvarianten, die keine Expression des Zielantigens mehr auf ihrer Oberfläche aufweisen und damit gegen die zielgerichteten CAR-T-Zellen resistent sind. Zudem erwies sich das Auftreten von Nebenwirkungen, wie dem „Zytokin-Sturm“ (*cytokine release syndrom*, CRS), dem Tumorlyse-Syndrom (TLS) und dem *on-target-off-tumor* Effekt, bei dem das Zielantigen nicht ausschließlich im Tumor, sondern auch in gesundem Gewebe exprimiert wird, als problematisch (Grupp et al., 2013; Lee et al., 2015; Morgan et al., 2010). Ein Ansatz, der die Einschränkungen der konventionellen CAR-Technologie umgeht, umfasst die Entwicklung von UniCARs (*universal chimeric antigen receptors*). UniCAR-exprimierende T-Zellen sind in der Lage, abhängig von einem rekombinanten Adaptormolekül eine Vielzahl von verschiedenen Tumorantigenen zu erkennen. Die Strategie basiert auf einem nicht-immunogenen Peptid-Motiv von 10 Aminosäuren, welches von einem humanen Zellkern-Protein abgeleitet ist. Die genmodifizierten T-Zellen exprimieren einen CAR, der gegen dieses Peptid-Motiv gerichtet ist. In den zugehörigen Adaptormolekülen (*target modules*) ist dieses Peptid an eine spezifische Antigen-Bindedomäne (scFv) fusioniert. Um die CAR-T-Zellen zu aktivieren, muss das rekombinante Fusionsprotein dem System hinzugefügt werden. Dadurch ist die Aktivität der UniCAR-exprimierenden T-Zellen steuerbar und unerwünschte Nebeneffekte können vermieden werden. Zudem ist die Antigen-Bindedomäne leicht austauschbar, sodass auf Tumorzellvarianten mit neuen Zielantigenen reagiert werden kann (Cartellieri et al., 2016).

Die antitumorale Wirkung chimärer Antigenrezeptoren wurde hauptsächlich für autologe T-Zellen nachgewiesen. Daneben repräsentieren CAR NK-Zellen einen weiteren Effektorzelltyp in der gezielten Krebs-Immuntherapie. CAR NK-Zellen besitzen die vorteilhafte Eigenschaft, dass die endogene natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen die CAR-vermittelte antitumorale Aktivität ergänzen kann. Weiterhin modulieren NK-Zellen durch die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen und durch Zell-Zell-Interaktionen die adaptive Immunität. Zudem wurde gezeigt, dass von allogenen Spender-NK-Zellen, anders als bei allogenen T-Zellen, nur eine geringe Gefahr einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (*graft-versus-host disease*, GvHD) ausgeht. (Klingemann, 2014). Damit eröffnet sich die Möglichkeit, neben patienteneigenen Zellen und Spendern auch allogene NK-Zelllinien für den CAR-Transfer zu nutzen.

1.3 Natürliche Killerzellen

1.3.1 Funktion

Natürliche Killerzellen sind neben Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten Teil des angeborenen Immunsystems und wurden erstmals Mitte der 1970er Jahre beschrieben. Die Zellen wurden damals als eine unbekannte Population von Lymphozyten definiert, welche ohne vorherige Sensibilisierung in der Lage waren, Tumorzellen abzutöten (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975; Murphy et al., 2012). Wie bedeutend diese Fähigkeit ist, wurde in der Literatur bereits mehrfach herausgestellt. So wurde gezeigt, dass NK-Zell-defiziente Mäuse eine gesteigerte Tumorbildung aufweisen (Smyth et al., 2001a) und eine geringe Anzahl von NK-Zellen im peripheren Blut des Menschen zu einem erhöhten Krebsrisiko führt (Imai et al., 2000). Neben der Eliminierung von Tumorzellen spielen NK-Zellen auch eine essentielle Rolle bei der Beseitigung virusinfizierter Zellen (Biron et al., 1999).

Humane NK-Zellen gehen aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen hervor, machen rund 5-10% aller zirkulierenden, mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) aus und werden durch die Oberflächenexpression von CD16 und CD56, sowie durch das Fehlen von CD3 von anderen Lymphozyten-Populationen abgegrenzt (Cooper et al., 2001; Papamichail et al., 2004). Zudem werden zwei Subpopulationen von NK-Zellen unterschieden (Lanier et al., 1986). 10% der peripheren NK-Zellen sind durch einen CD16^{dim/-} CD56^{bright} Phänotyp gekennzeichnet. Hierbei handelt es sich um NK-Zellen, die große Mengen an immunregulatorischen Zytokinen, wie IFN- γ , TNF (*tumor necrosis factor*)- α , MIP (*macrophage inflammatory protein*)-1 α , GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), IL-10 und IL-13 produzieren, die unter anderem an der Aktivierung von dendritischen Zellen und T-Zellen beteiligt sind (Gerosa et al., 2002; Martin-Fontecha et al., 2004; Pace et al., 1983; Poli et al., 2009). 90% der peripheren NK-Zellen zeichnen sich durch einen CD16⁺

CD56^{dim} Phänotyp aus. Diese zytotoxischen NK-Zellen besitzen intrazelluläre Granula mit Perforin und Granzymen, die in Folge einer Aktivierung freigesetzt werden, um die Zielzelle zu lysieren (Jacobs et al., 2001; Trapani and Smyth, 2002).

1.3.2 Erkennung von Zielzellen und Zytotoxizitätsmechanismen

Der Aktivierungszustand von NK-Zellen wird durch Keimbahn-kodierte, inhibierende und aktivierende Rezeptoren gesteuert, mit denen die Zellen in der Lage sind, zwischen gesunden und entarteten, gestressten oder virusinfizierten Zellen zu unterscheiden (Raulet et al., 2001). Der *Missing-Self*-Hypothese zufolge regeln solche Zielzellen häufig ihre endogenen MHC-Klasse I Moleküle herunter, um vor allem der Lyse durch MHC-Klasse I-abhängige zytotoxische CD8⁺ T-Zellen zu entgehen (Karre et al., 1986; Ljunggren and Karre, 1985, 1990). Damit sind diese Zellen allerdings angreifbarer für NK-Zellen. Diese binden über inhibierende Killerzell-Immunglobulin-artige Rezeptoren (*killer cell immunoglobulin-like receptors*, KIRs) an MHC-Klasse I Moleküle auf gesunden Zellen und werden dadurch in ihrer Funktion gehemmt. Bindet die NK-Zelle an eine Zielzelle mit reduzierter oder fehlender MHC-Klasse I Expression, so wird in der NK-Zelle ein stimulierendes Signal erzeugt, welches zur Aktivierung der NK-Zellen und zur Lyse der Zielzelle führt. Neben inhibierenden KIRs werden die MHC-Klasse I Moleküle auch von inhibierend wirkenden Leukozyten-Immunoglobulin-artigen Rezeptoren (*leukocyte immunoglobulin-like receptors*, LILR) und dem CD94-NKG2A Heterodimer erkannt, die zur Familie der C-Typ-Lektin-artigen Rezeptoren gehören (Borrego et al., 1998; Cosman et al., 1997). Alle inhibierenden Rezeptoren auf NK-Zellen besitzen ein gemeinsames Signalmotiv, welches als ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) bezeichnet wird und in der zytoplasmatischen Domäne lokalisiert ist (Tomasello et al., 2000). Bindet ein inhibierender Rezeptor an einen Liganden, so werden Tyrosin-Reste im ITIM durch Src-Kinasen phosphoryliert. Dem folgt die Rekrutierung und Aktivierung von Phosphatasen, wie beispielsweise den Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2, die verschiedene Signalproteine dephosphorylieren und damit die NK-Zell-Aktivierung inhibieren.

Allerdings hängt die Zytotoxizität der NK-Zelle nicht ausschließlich von der Detektion der MHC-Klasse I Moleküle ab. Durch zellulären Stress oder DNA-Schäden kommt es auch zur vermehrten Expression von Liganden auf der Zielzelle, die durch aktivierende NK-Zell-Rezeptoren erkannt werden und die NK-Zelle stimulieren (Lanier et al., 1997). Die humanen aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren umfassen sowohl Mitglieder der KIRs, der C-Typ-Lektine (NKG2D), als auch die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCRs, wie NKp30, NKp44, NKp46) und CD244 (2B4) (Pegram et al., 2011). Aktivierende KIRs und NCRs sind mit akzessorischen Proteinen, wie CD3 ζ , DAP12 und Fc ϵ RI- γ assoziiert, die ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAMs) besitzen und darüber die Signalweiterleitung vermitteln (Bottino et al.,

2005; Lanier, 2008; Tomasello et al., 2000). Die Bindung des Liganden an die aktivierenden KIRs oder NCRs induziert die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten der ITAMs durch Src-Kinasen, was zur Rekrutierung und Aktivierung von SH2 Tyrosin-Kinasen (Syk oder ZAP70) führt, die weitere Signalkaskaden auslösen. Der aktivierende Rezeptor NKG2D bildet mit dem Transmembranprotein DAP10 hexamere Komplexe, die aus zwei DAP10 Homodimeren und einem NKG2D Homodimer aufgebaut sind (Wu et al., 1999). Anders als das ITAM-tragende DAP12 bindet DAP10 entweder an Grb2 oder an die p85-Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (Lanier, 2008). Bei den Liganden von NKG2D handelt es sich um Mitglieder der CMV-abgeleiteten ULBPs (*UL-16 binding protein*) oder der MICA/B (*MHC class I polypeptide-related sequence A/B*) Familie, die häufig auf der Oberfläche von virusinfizierten- Zellen oder Tumorzellen exprimiert werden (Cosman et al., 2001; Coudert and Held, 2006; Sutherland et al., 2002). Der Rezeptor CD244 (2B4) ist ein Mitglied der SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*) und trägt in der intrazellulären Domäne ein ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) (Brown et al., 1998; Ma et al., 2007). Dieses Motiv wird nach der Bindung an den Liganden CD48 phosphoryliert, was zur Rekrutierung von Signalmolekülen wie SAP (*SLAM-activated protein*) oder EAT-2 (*EWS-FLI1-activated transcript 2*) führt, die ihrerseits die Signalweiterleitung vermitteln.

Neben den genannten aktivierenden Rezeptoren exprimieren CD56^{dim} NK-Zellen CD16 (FcγRIIIa), einen niedrig-affinen IgG-Rezeptor, der den Fc-Teil von Antikörpern erkennt, welche an die Zielzelle gebunden haben. Dadurch wird die Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) induziert und die Zielzelle wird letztendlich lysiert (Watzl and Long, 2010). Dabei erfolgt die Signalweiterleitung ebenfalls über ITAM-tragende akzessorische Proteine wie CD3ζ und FcεRIγ.

Die Zytotoxizität der NK-Zellen basiert auf der gerichteten Exozytose lytischer Granula (Trapani and Smyth, 2002). Durch die Aktivierung der NK-Zelle über ITAM-tragende NK-Zell-Rezeptoren erfolgt eine Umstrukturierung des Zytoskeletts über Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs) wie Vav1, Vav2 und Vav3, was zur Zellpolarisation und zur Freisetzung zytolytischer Enzyme aus intrazellulären Granula (Degranulation) führt (Bustelo, 2001; Turner and Billadeau, 2002). Daneben ist auch die Aktivierung der PI3K durch Syk oder ZAP-70 für die Fusion der zytotoxischen Granula mit der Zellmembran von Bedeutung (McVicar and Burshtyn, 2001; Tomasello et al., 2000). So führt die Aktivierung von PI3K zu der Bildung von PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) an der inneren Plasmamembran. Dies wiederum initiiert die Rekrutierung der Phospholipasen PLC-γ1 und PLC-γ2, die PIP₃ hydrolysieren. Dabei entsteht u.a. IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat), was die Freisetzung von Ca²⁺ Ionen fördert und die Degranulation der NK-Zelle auslöst. Die Degranulation erfolgt nur, wenn die Gesamtheit der aktivierenden Signale größer

ist als die Gesamtheit der inhibierenden Signale. Für die Vermittlung ihrer Zytotoxizität muss die NK-Zelle direkten Kontakt zur Zielzelle aufnehmen. Diese Kontaktstelle wird als immunologische Synapse (IS) definiert. Hierbei kommt es zur räumlichen und zeitlichen Konzentrierung von zytolytischen Enzymen und Zytokinen, die aus den Granula der NK-Zelle in den synaptischen Spalt zwischen Ziel- und NK-Zelle abgegeben werden (Mazzon and Viola, 2007). So setzen NK-Zellen u.a. GrB (Granzym B) und Perforin aus ihren Granula frei. In Anwesenheit von Ca^{2+} bildet das monomere Perforin ein ringförmiges Polymer in der Membran der Zielzelle, deren Integrität dadurch zerstört wird (Smyth et al., 2001b). GrB kann in der Folge in die Zielzelle eindringen und induziert dort die proteolytische Aktivierung von Pro-Caspasen und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, was zur Apoptose führt (Thiery et al., 2011; Thiery et al., 2010). Neben der Exozytose von lytischen Proteinen sind NK-Zellen in der Lage, eine Zielzelle über die Aktivierung von Todesrezeptoren abzutöten. NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche die Liganden Fas-L (Fas-Ligand) und TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), welche an die entsprechenden Rezeptoren auf der Zielzelle binden. Infolge dessen kommt es in der Zielzelle zur Bildung des DISC (*death inducing signaling complex*), welcher über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose induziert (Oshimi et al., 1996; Zamai et al., 1998).

1.3.3 Modulation der angeborenen und adaptiven Anti-Tumor-Immunität durch NK-Zellen

Neben den Zytotoxizitätsmechanismen, die den direkten Zell-Zell-Kontakt erfordern, sind NK-Zellen auch indirekt an der Eliminierung von Tumorzellen beteiligt. So sekretieren NK-Zellen immunregulatorische Zytokine und Chemokine wie $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, und $\text{MIP-1}\alpha$, die die angeborene und adaptive Anti-Tumor-Antwort modulieren. Das von NK-Zellen ausgeschüttete $\text{IFN-}\gamma$ fördert die Produktion Tumor-spezifischer Antikörper durch B-Zellen und stimuliert die Sekretion von Th1 -Zytokinen, die wiederum die Differenzierung von aktivierten CD8^+ Lymphozyten zu CTLs begünstigen (Martin-Fontecha et al., 2004).

Zudem kann das von NK-Zellen sekretierte $\text{IFN-}\gamma$ die Polarisierung von Makrophagen in Richtung des M1-Phänotyps lenken (Biswas and Mantovani, 2010). M1-Makrophagen sekretieren hohe Mengen pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-12, IL-23, $\text{TNF-}\alpha$, und Chemokine, wie CXCL9, die die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T-Helfer-Zellen des Th1 -Subtyps fördern. Daneben fungieren M1-Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs), die sich durch eine erhöhte Oberflächenexpression der HLA-Klasse I Moleküle, sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auszeichnen und die Aktivierung naiver CD4^+ T-Zellen vermitteln. Zudem töten M1-Makrophagen neoplastisch veränderte Zellen ab (Mantovani and Sica, 2010). Interessanterweise üben Makrophagen auch einen Einfluss auf NK-Zellen aus (Michel et al., 2012; Nedvetzki et al., 2007). So wurde

nach *in vitro* Ko-Kultur der genannten Zelltypen nachgewiesen, dass LPS-stimulierte Makrophagen die Proliferation von NK-Zellen, deren IFN- γ Sekretion und Zytotoxizität gegenüber ausgewählten Zielzellen steigern. Weiterhin wurde eine erhöhte Expression aktivierender Rezeptoren, wie NKp46, auf der Oberfläche der NK-Zellen beobachtet. Dabei scheint vor allem die Interaktion zwischen dem NK-Zell-Rezeptor 2B4 und seinem Liganden CD48 auf Makrophagen für die Makrophagen-vermittelte NK-Zell-Aktivierung eine Rolle zu spielen.

NK-Zellen interagieren bidirektional auch mit dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs, Abb. 1.2). DCs sind professionelle APCs, die durch Antigen-Aufnahme, -Prozessierung und -Präsentation über HLA-Klasse I und II Moleküle die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induzieren (Savina and Amigorena, 2007). NK-Zellen beeinflussen vor allem die Reifung dendritischer Zellen (Walzer et al., 2005). So sekretieren aktivierte NK-Zellen große Mengen der Zytokine IFN- γ und TNF- α , die an dem Reife-Prozess unreifer DCs (*immature* DCs, iDCs) beteiligt sind (Nagasaki et al., 2010; Vitale et al., 2005a). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Reifung von iDCs über Ligandeninteraktion mit den NK-Zell-Rezeptoren NKp30 und DNAM-1 vorangetrieben wird (Pende et al., 2006). Reife DCs (*mature* DCs, mDCs) weisen eine gesteigerte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 auf ihrer Zelloberfläche auf (Reis e Sousa, 2006). Das wiederum begünstigt die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T-Helfer-Zellen des Th1-Subtyps. Zudem sekretieren mDCs die Zytokine IL-12, IL-15 und IL-18, die die IFN- γ Expression und die Zytotoxizität von NK-Zellen steigern (Ni et al., 2012; Walzer et al., 2005). Weiterhin sind NK-Zellen in der Lage, unreife DCs abzutöten, die an der Induktion von immunologischer Toleranz, u.a. durch Unterstützung der Expansion immunsupprimierender regulatorischer T-Zellen (*regulatory T cells*, Tregs), beteiligt sind (Ferlazzo et al., 2001; Piccioli et al., 2002). Dabei unterscheiden NK-Zellen zwischen iDCs und mDCs mit Hilfe von inhibierenden Rezeptoren wie NKG2A/CD94. So werden die Liganden dieser Rezeptoren, bei denen es sich um HLA-Klasse I und HLA-E Moleküle handelt, nur in geringen Mengen auf der Zelloberfläche von iDCs exprimiert. Dadurch erhalten NK-Zellen in der Summe ein stimulierendes Signal und töten iDCs ab. Reife DCs entgehen hingegen aufgrund einer gesteigerten Expression dieser Liganden der Lyse durch NK-Zellen (*DC editing*). Durch den für reife DCs geschaffenen Selektionsvorteil kann eine effiziente adaptive Immunantwort initiiert werden. So werden u.a. durch die NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen Antigene freigesetzt, die die DCs aufnehmen, prozessieren und nach ihrer Reifung über die HLA-Klasse I und II Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren (Albert et al., 1998; Savina and Amigorena, 2007). Die Antigen-beladenen mDCs wandern über die Lymphgefäße in die T-Zell-Regionen lokaler Lymphknoten ein und führen über die Interaktion mit naiven T-Zellen zur Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T-Helfer-Zellen des Th1-Subtyps und von CD8⁺ T-Zellen zu CTLs (*Cross-priming*).

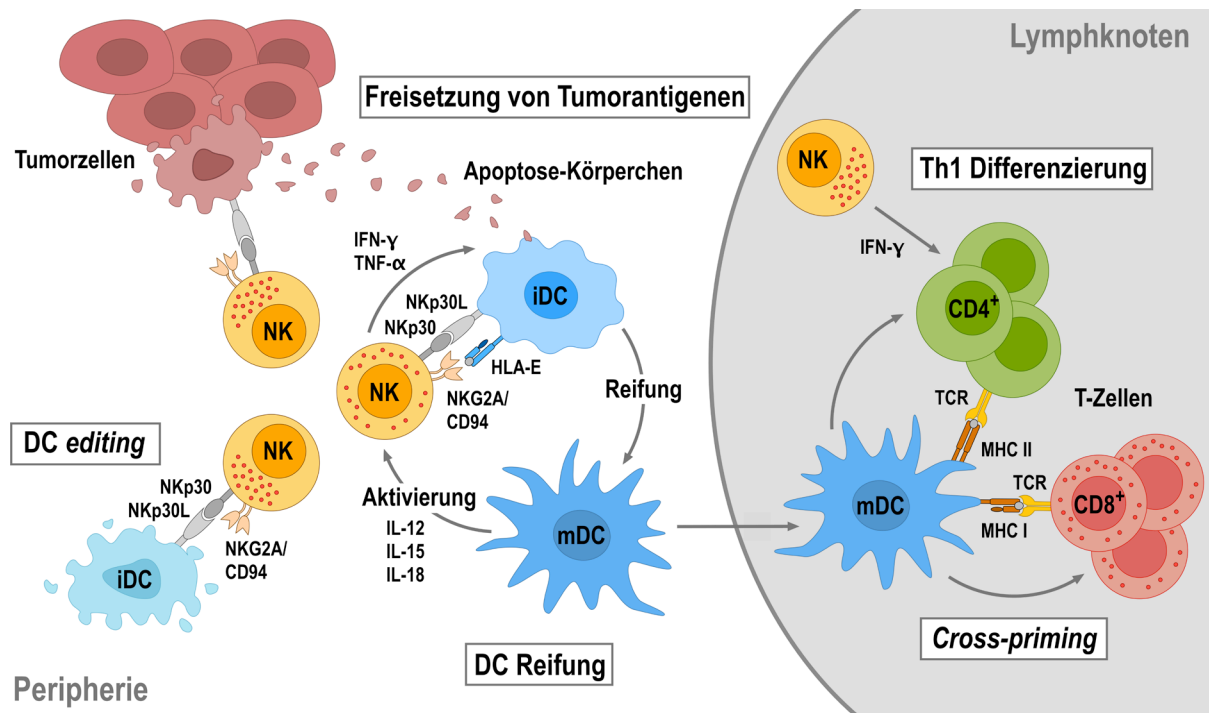


Abb. 1.2: Bidirektionale Interaktionen zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen (DCs). Nach Aktivierung durch Kontakt mit Tumorzellen sekretieren NK-Zellen (NK) große Mengen der Zytokine IFN- γ und TNF- α , die am Reife-Prozess unreifer dendritischer Zellen (*immature* DCs, iDCs) beteiligt sind. Zudem wird die DC-Reifung über Ligandeninteraktion mit den NK-Zell-Rezeptoren NKp30 und DNAM-1 vorangetrieben. Im Gegenzug nehmen reife DCs (*mature* DCs, mDCs) Einfluss auf NK-Zellen. So sekretieren mDCs die Zytokine IL-12, IL-15 und IL-18, die die IFN- γ Expression und die Zytotoxizität von NK-Zellen steigern. NK-Zellen sind in der Lage, zwischen iDCs und mDCs u.a. mit Hilfe von inhibierenden Rezeptoren wie NKG2A/CD94 zu unterscheiden. So weisen iDCs eine geringe Expression der Liganden HLA-Klasse I und HLA-E auf. Die NK-Zellen erhalten dadurch über den aktivierenden Rezeptor NKp30 in der Summe einen aktivierenden Stimulus und töten unreife DCs ab. Reife DCs verhindern hingegen durch die Heraufregulation von HLA-Klasse I und HLA-E ihre Lyse durch NK-Zellen und erhalten damit einen Selektionsvorteil (*DC editing*). Durch die NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen werden Antigene freigesetzt, die die DCs aufnehmen. Nachdem die DCs gereift sind, wandern die Antigen-beladenen mDCs über die Lymphgefäße in lokale Lymphknoten ein und präsentieren die aufgenommenen Antigene nach Prozessierung über HLA-Komplexe der Klasse I und II naiven T-Zellen. Dadurch induzieren DCs die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T-Helfer-Zellen des Th1-Subtyps und die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu CTLs (*Cross-priming*). NK-Zellen können ebenfalls in die Lymphknoten migrieren und über die Sekretion von IFN- γ die Th1-Polarisierung direkt fördern (modifiziert nach Zhang et al., 2017).

1.4 Zelluläre Immuntherapie mit NK-Zellen

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass NK-Zellen sowohl isolierte humane Tumorzellen, als auch diverse Tumorentitäten im Tiermodell abtöten können (Frohn et al., 2002; Karre et al., 1986; Torelli et al., 2005). Der erste Einsatz einer adoptiven Krebsimmuntherapie mit NK-Zellen erfolgte in den 1980er Jahren (Grimm et al., 1982; Rosenberg, 1985). Damals wurden autologe mononukleäre Zellen des peripheren Blutes isoliert und *in vitro* für 5 - 7 Tage mit IL-2 stimuliert, um Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) zu generieren. Dabei wurde festgestellt, dass die Anti-Tumor-Aktivität der LAK-Zellen hauptsächlich durch NK-Zellen vermittelt wurde. Die *ex vivo* generierten LAK-Zellen wurden für die Behandlung von malignen Erkrankungen wie metastasierenden Brustkrebs, Gliomen

und Nierenzellkarzinomen eingesetzt (Hayes et al., 1995; Rosenberg, 2000; Rosenberg et al., 1987). In einigen Patienten wurde nach der Behandlung ein stabiles Krankheitsbild oder ein Rückgang des Tumors beobachtet (Ishikawa et al., 2004). Jedoch weist die Applikation von autologen LAK- bzw. NK-Zellen eine Reihe von Limitationen auf. So sind die NK-Zellen von Patienten mit malignen Erkrankungen oft in ihrer Funktion gestört, was meist nicht durch eine *ex vivo* Expansion und Zytokin-Stimulierung behoben werden kann (Tonn et al., 2001). Zudem können autologe NK-Zellen durch die Heraufregulation der MHC-Klasse I Moleküle auf der Oberfläche von Tumorzellen inhibiert werden. Durch die Verwendung von allogenen Zellpräparaten aus verwandten oder nicht verwandten Spendern konnten die Einschränkungen der autologen NK-Zell-Therapie überwunden werden. Um die Jahrtausendwende wurde erstmals gezeigt, dass alloreaktive NK-Zellen nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) in einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) erfolgreich die Tumorzellen lysierten und zudem keine GvHD auslösten (Ruggeri et al., 1999; Ruggeri et al., 2002). Die Alloreaktivität ist damit zu begründen, dass Spender-NK-Zellen zumindest zum Teil inhibierende KIR-Rezeptoren für Liganden besitzen, die im Empfänger nicht exprimiert werden (*KIR-ligand mismatch*). Somit werden allogene NK-Zellen nicht im gleichen Maß wie autologe NK-Zellen in ihrer Zytotoxizität beeinträchtigt. Weitere Studien belegten die Sicherheit und Wirksamkeit des Einsatzes von alloreaktiven NK-Zellen aus haploidentischen (50% der der HLA-Antigene des Spenders stimmen mit denen des Empfängers überein) Spendern u.a. gegen refraktäre AML, refraktäres Hodgkin-Lymphom, metastasierendes Melanom, Nierenzellkarzinom, sowie Neuroblastome und Kolonkarzinome (Carlsten et al., 2007; Castriconi et al., 2004; Miller et al., 2005).

Zwar ist es möglich, alloreaktive NK-Zellen aus den PBMCs eines gesunden Spenders zu isolieren und zu expandieren, allerdings ist dieser Schritt sehr aufwendig, zeit- und kostenintensiv. So ist die Ausbeute von CD56⁺ NK-Zellen meist sehr variabel und die Proliferation der Zellen *in vitro* sehr unterschiedlich (Klingemann and Martinson, 2004). Zudem müssen die isolierten NK-Zellen von den zugleich aufgereinigten T-Zellen getrennt werden, da allogene T-Zellen im Patienten eine GvHD auslösen können, die im schlimmsten Fall tödlich verläuft (Boissel et al., 2008; Miller et al., 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass NK-Zellen nach 10-15 Teilungen unter Kulturbedingungen ihre Proliferation verringerten oder sogar komplett einstellten (Fujisaki et al., 2009). Daher stellt die Generierung einer in der Zellzahl ausreichenden, längerfristig bestehenden, reinen Population an alloreaktiven NK-Zellen noch immer eine große Herausforderung dar. So werden allogene NK-Zellen aus PBMCs *in vitro* mit Zytokinen (IL-2, IL-15, IL-21) und Wachstumsfaktoren stimuliert, um ihre Aktivität und Expansion zu steigern (Brehm et al., 2011; Suck et al., 2011; Wagner et al., 2017). Eine weitere Strategie fokussiert sich auf die Expansion von NK-Zellen mit Hilfe sogenannter *feeder* Zellen. Hierbei kamen bisher u.a. allogene PBMCs, genetisch modifizierte K562 Zellen, sowie andere

bestrahlte Tumorzelllinien zum Einsatz, welche in Ko-Kultur mit NK-Zellen deren Expansion effizient steigern können (Childs and Berg, 2013). Alternative Ansätze zur Generierung von allogenen NK-Zellen umfassen die Differenzierung von CD34⁺ Stammzellen des Knochenmarks oder des Nabelschnurblutes zu NK-Zellen bzw. die Differenzierung von NK-Zellen aus humanen embryonalen Stammzellen (*human embryonic stem cells*, hESC) oder induzierten pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stem cell*, iPSCs) (Luevano et al., 2012; Ni et al., 2011; Spanholtz et al., 2010; Woll et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von etablierten NK-Zelllinien dar, welche *in vitro* unter GMP (*good-manufacturing practice*)-Bedingungen expandiert und genetisch modifiziert werden können. Diese können in ausreichender Menge für eine klinische Anwendung bereitgestellt werden und sind zudem sehr gut charakterisiert. So wurde bereits die humane NK-Zelllinie NK-92 erfolgreich als allogenes Zelltherapeutikum in klinischen Studien eingesetzt (Klingemann et al., 2016).

1.4.1 Die NK-Zelllinie NK-92 als allogenes Zelltherapeutikum

Die humane NK-Zelllinie NK-92 wurde 1992 aus dem Blut eines an einem Non-Hodgkin-Lymphom erkrankten Patienten isoliert und ähnelt in ihren phänotypischen und funktionalen Eigenschaften aktivierten NK-Zellen. Das Überleben und das Wachstum dieser Zelllinie sind von IL-2 abhängig. Weiterhin zeichnet sich NK-92 durch das Fehlen von CD16 (FcγRIIIa) aus, sodass die Zellen keine ADCC auslösen können (Gong et al., 1994). Im Vergleich zu physiologischen NK-Zellen weisen NK-92 Zellen eine höhere zytolytische Aktivität gegenüber einer Vielzahl von malignen Zellen des Blutsystems und anderen Tumorzellen auf, was mit dem Fehlen der meisten inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren in NK-92 begründet wird (Klingemann and Miyagawa, 1996; Klingemann et al., 1996). Eine Ausnahme bilden die inhibierenden Rezeptoren NKG2A/CD94, KIR2DL4 und ILT2 (*Ig-like transcript 2*)/CD85j, deren Expression auf NK-92 Zellen detektiert wurde (Maki et al., 2001). Für den Rezeptor KIR2DL4 wurde neben der inhibierenden auch eine aktivierende Funktion nachgewiesen. In Bezug auf aktivierende Rezeptoren wurde gezeigt, dass NK-92 Zellen die Rezeptoren NKp30, NKp46, 2B4 und NKG2D exprimieren (Maki et al., 2001; Maki et al., 2003). NK-92 Zellen vermitteln ihre Zytotoxizität hauptsächlich über die Exozytose lytischer Granula, welche u.a. Perforin, Granzym A (GrA) und GrB beinhalten (Mahrus and Craik, 2005). Von Bedeutung ist zudem, dass NK-92 Zellen, trotz erhöhter zytolytischer Aktivität gegenüber Tumorzellen, gesunde allogene Zellen nicht angreifen (Klingemann et al., 1996). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich intravenös injizierte NK-92 Zellen nicht in immundefizienten SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäusen etablieren konnten, d.h. dass die Injektion der Zellen zumindest in diesem Modell nicht zu der Ausbildung eines sekundären Lymphoms führte, unabhängig davon, ob die Zellen zuvor Gammastrahlen ausgesetzt wurden oder nicht. Unter Verwendung desselben Mausmodells wurde die Wirksamkeit von NK-92 Zellen gegenüber transplantierten

humanen Tumorzellen bestätigt (Klingemann and Miyagawa, 1996; Klingemann et al., 1996; Tam et al., 1999; Yan et al., 1998).

Die beschriebenen Eigenschaften zusammen mit der Tatsache, dass NK-92 Zellen *in vitro* sehr gut unter GMP-Bedingungen expandierbar sind, begründen den Einsatz dieser Effektorzelllinie für die adoptive Krebsimmuntherapie (Tam et al., 2003; Tonn et al., 2001). So wurden die Zellen bereits in klinischen Studien der Phase-I getestet. Diese zeigten, dass die Applikation von NK-92 Zellen in Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen gut verträglich und sicher ist (Arai et al., 2008; Boyiadzis et al., 2017; Tonn et al., 2013; Williams et al., 2017). Die NK-92 Zellen wurden dabei vor Verabreichung mit 10 Gy bestrahlt, um ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen und damit die ansonsten nicht vollständig ausschließbare Entwicklung eines sekundären Lymphoms in Patienten zu verhindern. Eine Anti-Tumor-Aktivität der NK-92 Zellen wurde bei einigen Patienten mit Nierenzellkrebs, Lungenkrebs und bei einem Patienten mit metastasiertem Melanom beobachtet (Arai et al., 2008; Tonn et al., 2013). Dies äußerte sich beispielsweise in einer Stabilisierung der Erkrankung und der Regression von Lungen- und Lymphknotenmetastasen. Allerdings konnte das Fortschreiten dieser Tumorerkrankungen nicht aufgehalten werden. Eine komplette Abstoßung des Tumors wurde jedoch in einem Patienten mit rezidiertem Hodgkin-Lymphom und einem Patienten mit rezidiertem multiplem Myelom nach Verabreichung der NK-92 Zellen erzielt (Williams et al., 2017). Seit 2015 werden NK-92 Zellen in einer klinischen Phase-II-Studie zur Behandlung des Merkelzellkarzinoms geprüft (NCT02465957).

Um die antitumorale Aktivität von NK-92 Zellen weiter zu steigern, wurden in dieser und anderen Arbeitsgruppen genmodifizierte NK-92 Zellen generiert, die nach retro- oder lentiviralen Gentransfer chimäre Antigenrezeptoren exprimieren. Damit können CAR-exprimierende NK-92 Zellen definierte Oberflächenantigene von Tumorzellen selektiv erkennen und Antigen-positive Zellen hämatologischer und solider Tumoren effizient abtöten (Zhang et al., 2017).

1.4.2 Die zielgerichtete NK-92 Zelllinie NK-92/5.28.z

Die in dieser Arbeitsgruppe entwickelte CAR NK-92 Zelllinie NK-92/5.28.z erkennt das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 und wird gegenwärtig in einer klinischen Phase-I-Studie zur Behandlung des rezidierten Glioblastoms eingesetzt (NCT03383978). NK-92/5.28.z Zellen stellen einen unter GMP-Bedingungen abgeleiteten Einzelzellklon von NK-92 dar, der nach lentiviraler Transduktion einen CAR der 2. Generation exprimiert. Dieser CAR besteht aus einem scFv-Antikörperfragment, zusammengesetzt aus den variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L), abgeleitet von dem ErbB2-spezifischen monoklonalen Antikörper FRP5 (Schonfeld et al., 2015). Dem folgt eine CD8 α Gelenkregion und die Transmembran- und kostimulatorische Domäne von CD28 und die CD3 ζ Signaldomäne (5.28.z). Die Antigen-

spezifische Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen wurde *in vitro* mit ErbB2-positiven Tumorzellen, die gegen parentale NK-92 Zellen resistent sind, bestätigt. Auch eine *in vivo* Anti-Tumor-Wirkung dieser Zellen wurde im Tiermodell belegt. So wurde zunächst nachgewiesen, dass intravenös applizierte NK-92/5.28.z Zellen in der Lage waren, innerhalb von 24 h nach Injektion in orthotope Mammakarzinome zu infiltrieren (Schonfeld et al., 2015). In immundefizienten Mäusen führte die Behandlung mit NK-92/5.28.z Zellen nach intravenöser Injektion von Nierenzellkarzinomzellen zu einer signifikanten Reduktion von Lungenmetastasen, wohingegen die Behandlung mit parental NK-92 Zellen keinen Einfluss auf die Ausbildung von Lungentumoren hatte. In immunkompetenten C57BL/6 Mäusen, die im Gehirn syngene ErbB2-exprimierende GL261-Gliome trugen, wurde eine Mehrzahl der Tiere durch die lokale Behandlung mit NK-92/5.28.z Zellen geheilt (Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2017). In diesen Tieren wurde eine durch die Behandlung mit NK-Zellen induzierte humorale Immunantwort gegen die Tumorzellen nachgewiesen und ohne nochmalige Behandlung eine Abstoßung erneut implantierter ErbB2-positiver und -negativer GL261 Zellen beobachtet. Dies zeigt, dass die Therapie mit NK-92/5.28.z Zellen einen immunologischen Langzeitschutz durch das endogene Immunsystem gegen die Ausbildung neuer Tumoren bewirkte. Im Vergleich dazu war die Injektion von parental NK-92 Zellen erfolglos und die so behandelten Mäuse mussten aufgrund fortschreitenden Tumorwachstums getötet werden. Eine mögliche Erklärung für den durch NK-92/5.28.z Zellen ausgeübten Adjuvant-Effekt könnte die Freisetzung von Tumorantigenen aus abgetöteten Tumorzellen sein, die durch Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen und präsentiert werden, was die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induziert (Albert et al., 1998; Iyoda et al., 2002). Zudem können sich B-Zellen im Zuge des Antigen-Kontakts und der Stimulation durch T-Helfer-Zellen zu Plasmazellen differenzieren, die spezifische Antikörper gegen Tumorantigene produzieren (Nutt et al., 2015; Reuschenbach et al., 2009; Suan et al., 2017). Primäre NK-Zellen töten unreife immunsupprimierende DCs ab und begünstigen die Reifung von DCs (Van Elssen et al., 2014). Solche Effekte könnten auch im Fall der CAR NK-92 Zellen zur Initiierung einer endogenen Anti-Tumor-Immunantwort beitragen. Weiterhin könnte die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch aktivierte NK-92/5.28.z Zellen die Aktivität von Immunzellen im Tumor-Mikromilieu beeinflussen. In der Tat wurde in *in vitro* Versuchen festgestellt, dass CAR NK-92 Zellen nach Kontakt mit Antigen-positiven Tumorzellen große Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und GM-CSF in den Kulturüberstand sekretierten, welche einen positiven Einfluss auf die endogene Immunantwort haben können (Genssler et al., 2016; Nowakowska et al., 2018; Oelsner et al., 2017; Schonfeld et al., 2015). Interessanterweise wurde aber auch eine starke Ausschüttung des immunregulatorischen Zytokins IL-10 nach Aktivierung der CAR NK-92 Zellen festgestellt.

1.5 Rolle des Zytokins Interleukin-10 im Immunsystem

1.5.1 Expression von IL-10

IL-10 wurde bereits 1989 als ein von Th2-Zellen sekretiertes Zytokin beschrieben, welches in der Lage war, die Synthese von IFN- γ in Th1-Zellen zu hemmen (Fiorentino et al., 1989). Daraus resultierte die Bezeichnung *cytokine synthesis inhibiting factor* (CSIF), bevor 1990 die Umbenennung in IL-10 erfolgte (Moore et al., 1990). Das Zytokin ist neben IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 und IL-29 Mitglied der Typ-II-Zytokinfamilie (Commings et al., 2008). IL-10 wird von einer Vielzahl von Zellen sekretiert, wie z.B. von Th1-, Th2- und Th17-Zellen, regulatorischen T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen sowie Mastzellen (Boonstra et al., 2006; de Waal Malefyt et al., 1991b; Del Prete et al., 1993; Deniz et al., 2008; Fiorentino et al., 1989; Groux et al., 1997; Lin and Befus, 1997; Nakajima et al., 1996; Ocuin et al., 2011; Pistoia, 1997; Saraiva et al., 2009).

Das humane IL-10-Gen ist auf dem Chromosom 1q31-q32 lokalisiert und umfasst fünf Exons und vier Introns mit einer Gesamtlänge von 5,2 Kilobasen (kb) (Eskdale et al., 1997). Die biologisch aktive Form von IL-10 ist ein säurelabiles Homodimer, welches aus zwei nicht-kovalent verbundenen Polypeptidketten besteht und ein Molekulargewicht von 37 kDa besitzt (Zdanov, 2010). Die Homologie der Aminosäuresequenzen zwischen der humanen und murinen Form des Zytokins beträgt 73%, wobei humanes IL-10 sowohl auf humanen und murinen Zellen wirksam ist, murines IL-10 hingegen ausschließlich murine Zellen beeinflusst (Vieira et al., 1991; Zdanov et al., 1995). Weiterhin konnte eine starke Homologie der Aminosäuresequenz von IL-10 zum BCRF1 Protein des Epstein-Barr-Virus nachgewiesen werden (Moore et al., 1990).

Die Produktion von IL-10 kann in Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen und Makrophagen, und T-Zellen durch unterschiedliche Stimuli induziert werden. Beispielsweise wird die IL-10 Expression durch die Erkennung von bakteriellen und viralen Strukturen anhand von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern durch *pattern recognition receptors* (PRRs) initiiert (Akbari et al., 2001; Saraiva and O'Garra, 2010; Siewe et al., 2006). In T-Zellen führt die Stimulierung von CD3 und CD28 zur Sekretion von IL-10 (Rafiq et al., 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass Zytokine wie IL-2, IL-7 und IL-15, die an die *common gamma chain*-Rezeptoren binden, die über CD3 induzierte IL-10 Produktion in T-Zellen verstärken (Cohen et al., 1997).

1.5.2 IL-10-vermittelte Signaltransduktion

Die biologische Aktivität von IL-10 wird durch die Bindung des Zytokins an den IL-10 Rezeptor (IL-10R) vermittelt (Liu et al., 1994) (Abb. 1.3). Dieser Transmembranrezeptor gehört zur Familie der Interferon-Rezeptoren (IFNR) bzw. der Klasse II-Zytokinrezeptoren und besteht aus den zwei Untereinheiten IL-10R1 (IL-10R α) und IL-10R2 (IL-10R β). Die Ligandenbindende Untereinheit IL-10R1 wird von den meisten hämatopoetischen Zellen exprimiert, hat ein Molekulargewicht von 90-120 kDa und bindet IL-10 mit einer relativ hohen Affinität ($K_d \sim 50-200$ pM). IL-10R2 wird konstitutiv von einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert und fungiert im IL-10-Rezeptorkomplex hauptsächlich als Signaldomäne (Josephson et al., 2001; Kotenko et al., 1997; Liu et al., 1994). Die Zusammenlagerung der Rezeptor-Untereinheiten wird durch die Bindung von IL-10 an IL-10R1 initiiert. Anschließend löst IL-10R1 eine Konformationsänderung in IL-10R2 aus, was die Bindung von IL-10R2 an IL-10 ermöglicht und zur Ausbildung eines Rezeptor-Heterotetramers, bestehend aus je zwei IL-10R1 und IL-10R2 Ketten, führt (Yoon et al., 2006). Dadurch erfolgt eine Aktivierung der Tyrosinkinasen Jak1 und Tyk2, welche mit den intrazellulären Domänen von IL-10R1 und IL-10R2 assoziiert sind. Jak1 und Tyk2 phosphorylieren spezifisch Tyrosinreste (Y446 und Y496) der intrazellulären Domäne von IL-10R1, was die Rekrutierung von STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) Monomeren und deren Phosphorylierung zur Folge hat (Kotenko et al., 1997; Liu et al., 1994; Murray, 2007). Das wiederum initiiert die Bildung von STAT3 Homodimeren, die in den Zellkern translozieren. Dort bindet STAT3 mit hoher Affinität an STAT3-bindende Elemente von Promotoren und aktiviert die Transkription von Genen, die die IL-10 Wirkung vermitteln (Finbloom and Winestock, 1995; Hu et al., 2007). So induziert STAT3 beispielsweise die Expression des *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), welcher die Signalweiterleitung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-12 unterbindet (Berlato et al., 2002; Williams et al., 2004a). Allerdings inhibiert die konstitutive Expression von SOCS3 aber auch den Signalweg von IL-10 (negativer *feedback-loop*). Neben der Aktivierung von STAT3 resultiert die Interaktion von IL-10 mit dem IL-10 Rezeptor in der Phosphorylierung und Aktivierung von STAT1 und STAT5 (Finbloom and Winestock, 1995). Die Rolle von STAT1 und STAT5 in der IL-10 Signaltransduktion ist noch weitgehend ungeklärt. So wurde nachgewiesen, dass IL-10 die Heraufregulation der CD14 Expression in Monozyten über die Aktivierung von STAT1 vermittelt (Rahimi et al., 2005; Williams et al., 2004b). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IL-10 in CD8⁺ T-Zellen den Transkriptionsfaktor NF- κ B und den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg aktiviert (Crawley et al., 1996; Mocellin et al., 2004a).

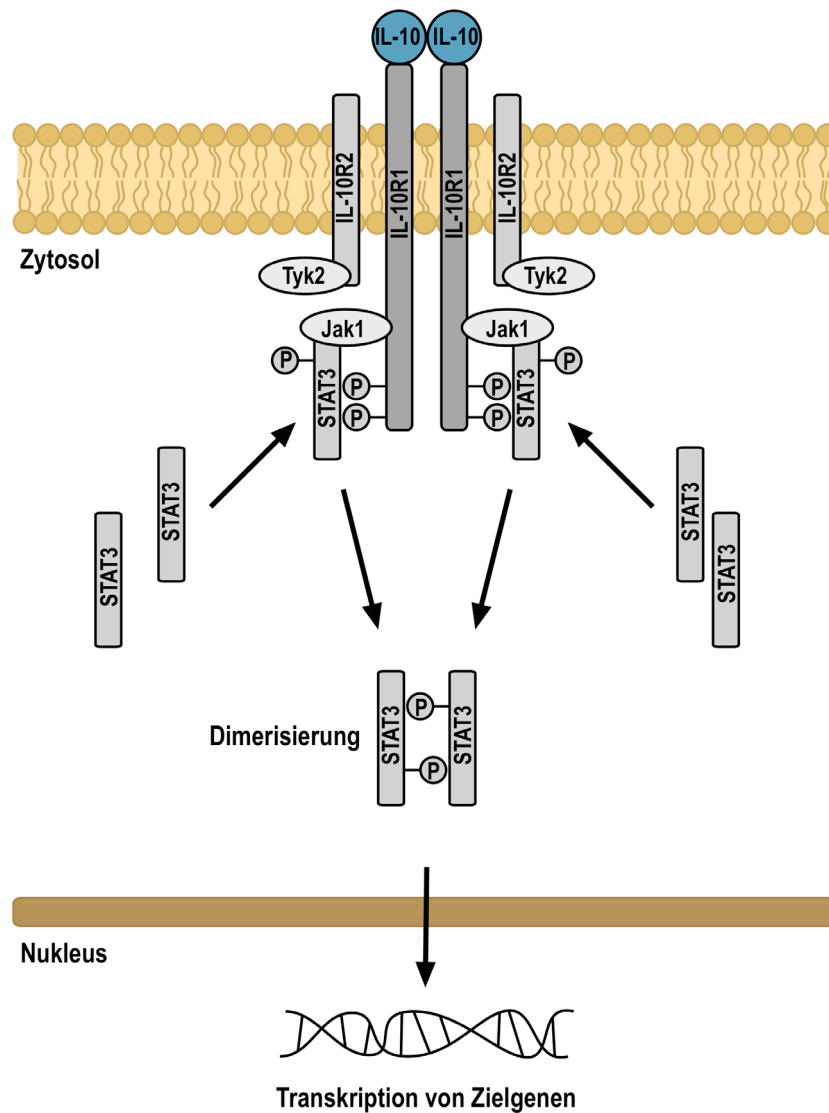


Abb. 1.3: IL-10-vermittelte Signaltransduktion über STAT3. Die Bindung von IL-10 an die Rezeptor-Untereinheit IL-10R1 löst eine Konformationsänderung in IL-10R2 aus und führt zur Ausbildung des Rezeptor-Heterotetramers, bestehend aus zwei IL-10R1 und IL-10R2 Ketten. Dadurch erfolgt die Aktivierung der mit dem Rezeptor assoziierten Tyrosinkinasen Jak1 und Tyk2. Nach der Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste (Y446 und Y496) der intrazellulären Domäne von IL-10R1 werden STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) Monomere rekrutiert, die ebenfalls phosphoryliert werden, was wiederum die Bildung von STAT3 Homodimeren initiiert. Diese translokieren in den Nukleus und agieren dort als Transkriptionsfaktoren. Jak1: Januskinase 1, Tyk2: Tyrosinkinase 2.

1.5.3 Biologische Wirkung von IL-10 auf Zellen des Immunsystems

In der Vergangenheit wurde IL-10 als ein immunsupprimierendes Zytokin definiert, mit der Hauptfunktion, eine Entzündungsreaktion einzudämmen. Die Unerlässlichkeit dieser Funktion konnte bereits 1993 in IL-10-defizienten Mäusen gezeigt werden. So entwickelten Mäuse mit einem kompletten IL-10 *knockout* eine chronische Darmentzündung, die vor allem durch eine unkontrollierte Reaktivität von CD4⁺ T-Zellen gegenüber Antigenen der Darmbakterien getrieben wurde (Kuhn et al., 1993; Sellon et al., 1998). IL-10-defiziente Mäuse verstarben rasch nach Infektion mit spezifischen Pathogenen, allerdings nicht aufgrund des schnellen

Wachstums der Pathogene, sondern aufgrund der massiven inflammatorischen Reaktion des Immunsystems, welche nicht mehr durch IL-10 abgeschwächt wurde (Gazzinelli et al., 1996). Mittlerweile gibt es jedoch eine Vielzahl an Daten, die zeigen, dass es sich bei IL-10 um ein Zytokin mit pleiotropen Effekten auf das angeborene und adaptive Immunsystem handelt, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen (zusammengefasst in Abb. 1.4).

IL-10 hemmt die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, GM-CSF, G-CSF, M-CSF und TNF- α in aktivierten Monozyten/Makrophagen (D'Andrea et al., 1993; de Waal Malefyt et al., 1991a; Fiorentino et al., 1991a; Gruber et al., 1994). Hierbei sind die inhibierenden Effekte von IL-10 auf IL-1 und TNF- α von besonderer Bedeutung, da diese Zytokine synergistisch auf pro-inflammatorische Signalwege wirken und die Expression von weiteren Mediatoren, wie Chemokinen und Prostaglandinen, induzieren. Dabei führt die Ausschüttung diverser Chemokine, wie MCP-1, Rantes, MIP-1 α , MIP-1 β und IP-10 zur Rekrutierung von Monozyten, dendritischen Zellen, Neutrophilen und T-Zellen, was ebenfalls durch IL-10 unterbunden wird (Kopydlowski et al., 1999). Andererseits wurde festgestellt, dass IL-10 die Expression von bestimmten Chemokin-Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten erhöht und so die Zellen reaktionsfähiger gegenüber chemotaktischen Faktoren macht (Sozzani et al., 1998; Thivierge et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Fähigkeit besitzt, die Antigen-Präsentation von Monozyten/Makrophagen und damit die T-Zell-Aktivierung zu beeinträchtigen. So inhibiert IL-10 die Expression der MHC-Klasse II Moleküle und des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (CD54), sowie die der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) (de Waal Malefyt et al., 1991b; Ding et al., 1993; Willems et al., 1994). Zudem führt IL-10 zu einer Verminderung der Expression des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4), den Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS), und steigert die Expression von CD14 und dem Scavenger-Rezeptor CD163, welcher durch LPS, TNF- α und IFN- γ herunterreguliert wird (Buechler et al., 2000; Muzio et al., 2000). Damit fördert IL-10 die Polarisierung von Makrophagen hin zu einem M2-Phänotyp, welcher immunsuppressive Eigenschaften besitzt, an der Beseitigung von Zelltrümmern beteiligt ist, sowie die Wundheilung und Angiogenese fördert (Martinez and Gordon, 2014). Darüber hinaus steigert IL-10 die Expression der Fc γ -Rezeptoren CD16 und CD64 auf der Oberfläche von Monozyten, was zu einer gesteigerten ADCC und Phagozytose von opsonisierten Partikeln, Bakterien oder Pilzen führt (Calzada-Wack et al., 1996; Capsoni et al., 1995; te Velde et al., 1992).

IL-10 beeinflusst nicht nur die Antigen-Präsentation von Monozyten und Makrophagen, sondern auch die von dendritischen Zellen. Auch hier hemmt IL-10 die Expression von MHC-Klasse II Molekülen und ICAM-1, sowie die des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf DCs des peripheren Blutes und Langerhans-Zellen, was die Antigen-vermittelte CD4⁺ T-Zell-Antwort beeinträchtigt (Buelens et al., 1995; Chatelain et al., 1998; Peguet-Navarro et al.,

1994). Die Expression von MHC-Klasse I Molekülen auf DCs wird durch IL-10 hingegen nicht beeinflusst (Morel et al., 1997). *In vitro* Experimente zeigten, dass IL-10 die Generierung von DCs aus Monozyten inhibiert und dabei die Differenzierung in einen Makrophagen-ähnlichen Zelltyp fördert (Allavena et al., 1998; Buelens et al., 1997; Fortsch et al., 2000). Zudem wurde festgestellt, dass IL-10 die Reifung von DCs beeinträchtigt (Corinti et al., 2001; De Smedt et al., 1997). So führte die Neutralisierung von autokrin produziertem IL-10 zu einer spontanen Reifung von DCs, die sich in einer erhöhten Oberflächenexpression der Marker CD80, CD83 und CD86 zeigte (Corinti et al., 2001). In einem ähnlichen Experiment konnte die von LPS oder dem CD40 Liganden induzierte erhöhte Expression von CD80, CD83, CD86 und HLA-DR auf DCs in Anwesenheit eines anti-IL-10 Antikörpers noch weiter gesteigert werden. Daneben verstärkte die Neutralisierung von IL-10 die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α . Reife DCs bleiben dagegen aufgrund der Herunterregulation des IL-10R1 weitgehend unbeeinflusst von IL-10 (Asadullah et al., 2003).

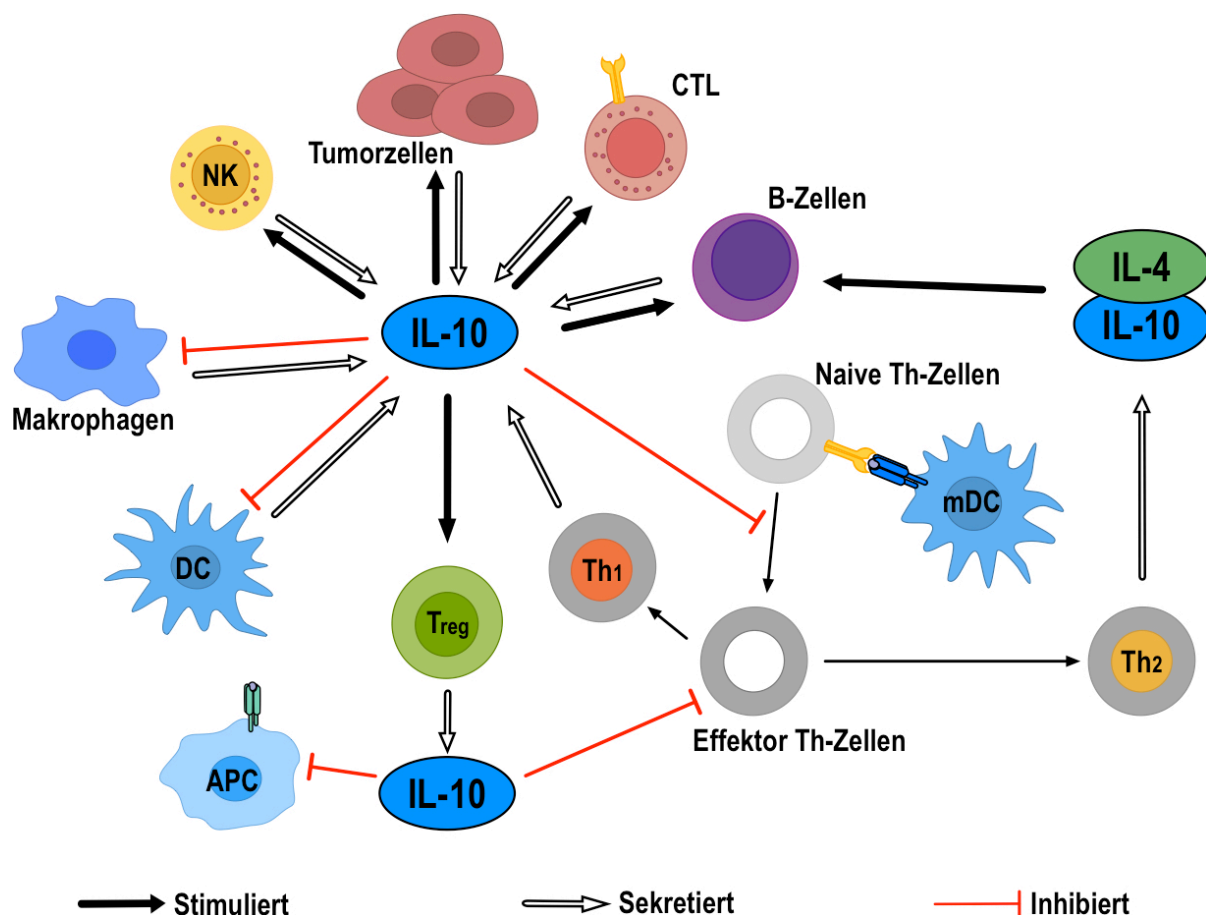


Abb. 1.4: Sekretion von IL-10 und regulatorische Wirkung auf Immunzellen. IL-10 wird von diversen Immunzellen und manchen Tumorzellen sekretiert (weiße Pfeile). Das Zytokin weist pleiotrope Effekte auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems auf. So wird beispielsweise die Zytotoxizität von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen gesteigert (stimulierende Wirkung, schwarze Pfeile), hingegen werden dendritische Zellen und Makrophagen in ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen gehemmt (inhibierende Wirkung, rotes Symbol). APC: Antigen-präsentierende Zelle, CTL: zytotoxische CD8⁺ T-Zelle, DC: dendritische Zelle, NK: natürliche Killerzelle, mDC: *mature dendritic cell*, reife dendritische Zelle, Th: T-Helfer-Zelle, Treg: regulatorische T-Zelle. Weitere Erklärung siehe Text.

Neben dem indirekten Einfluss über die Antigen-Präsentation übt IL-10 auch direkte Effekte auf T-Zellen aus. IL-10 wirkt sich negativ auf die Proliferation und Zytokinsynthese von IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 und TNF- α in CD4⁺ T-Zellen aus (Del Prete et al., 1993; Fiorentino et al., 1991b; Groux et al., 1996). Es werden dabei vor allem naive CD4⁺ T-Zellen, beispielsweise durch die Hemmung des CD28 Signalwegs, beeinträchtigt, wohingegen aktivierte und Gedächtnis-T-Zellen wegen der Herunterregulation des Rezeptors IL-10R1 unbeeinflusst bleiben (Akdis and Blaser, 2001; Liu et al., 1994). Während der Aktivierung von CD4⁺ Zellen fördert IL-10 zudem die Generierung von Tregs (Levings et al., 2001; Zeller et al., 1999). Eine Vielzahl von stimulierenden Effekten konnte im Zusammenhang mit CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. So fördert IL-10 die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen, steigert deren Proliferation und erhöht die Expression von IFN- γ in intratumoralen CD8⁺ T-Zellen (Chen and Zlotnik, 1991; Emmerich et al., 2012; Groux et al., 1998; MacNeil et al., 1990).

Zudem wirkt sich IL-10 positiv auf B-Zellen aus. Es steigert das Überleben von B-Zellen, indem es die Apoptose durch die verstärkte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 unterbindet (Itoh and Hirohata, 1995; Levy and Brouet, 1994). Weiterhin wurde gezeigt, dass IL-10 die Expression von hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) induziert, einer katalytischen Untereinheit der Telomerase, wodurch die Aktivität der Telomerase in B-Zellen gesteigert wird (Hu and Insel, 1999). In *in vitro* Versuchen wurde IL-10 als ein Faktor identifiziert, der die Proliferation von aktivierten Vorläufer- und reifen B-Zellen fördert (Rousset et al., 1992; Saeland et al., 1993). Die durch IL-10 induzierte Proliferation aktivierter B-Zellen konnte durch IL-2 noch weiter gesteigert werden, nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass IL-10 die Expression des hoch-affinen IL-2-Rezeptors auf B-Zellen erhöht (Fluckiger et al., 1993). Darüber hinaus unterstützt IL-10 die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen und die IgM-Synthese (Rousset et al., 1995). Außerdem spielt IL-10 eine Rolle im Antikörperklassenwechsel. So induziert IL-10 in Kombination mit IL-4 die IgG4-Produktion, blockiert die Synthese von IgE und fördert zusammen mit TGF- β die Sekretion von IgA1 und IgA2 (Defrance et al., 1992; Jeannin et al., 1998).

In Bezug auf NK-Zellen wurde beobachtet, dass IL-10 die *in vitro* Zytotoxizität und Aktivität der NK-Zellen stimulieren kann (Mocellin et al., 2003). Andererseits ist IL-10 in der Lage, die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α in NK-Zellen zu inhibieren und die Expression des NKG2D-Liganden MICA auf der Oberfläche von Melanomzellen herunter zu regulieren, was die Anti-Tumor-Effekte der NK-Zellen wiederum beeinträchtigt (Hsu et al., 1992; Serrano et al., 2011).

Neben den Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sekretieren auch einige Tumorzellen IL-10, wodurch sie der Immunüberwachung entgehen können. Beispielsweise wurde eine durch IL-10 vermittelte Herunterregulation von MHC-Klasse I und II Molekülen auf der Oberfläche von Melanomzellen nachgewiesen (Yue et al., 1997). Darüber hinaus nutzen

manche Tumorzellen, wie B-Zell-Lymphom- und Melanomzellen, das sekretierte IL-10 als autokrinen Stimulus für ein gesteigertes Wachstum (Masood et al., 1995; Yue et al., 1997).

1.5.4 Pleiotrope Effekte von IL-10 in präklinischen Tumormodellen

Auch in präklinischen *in vitro* und *in vivo* Tumormodellen zeigte sich, dass IL-10 ein Zytokin mit pleiotropen Effekten ist. Viele der dabei erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass IL-10 die Immunantwort gegen den Tumor dämpft. So führte die *in vitro* Behandlung von verschiedenen Tumorzelllinien mit IL-10 zu einer Herunterregulation von MHC-Klasse I Molekülen auf der Oberfläche, was bewirkte, dass die Tumorzellen gegenüber der Lyse durch CTLs resistent wurden (Kurte et al., 2004; Petersson et al., 1998). Weiterhin induziert IL-10 eine erhöhte Expression des nicht-klassischen HLA-Moleküls HLA-G, das u.a. die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und CTLs inhibiert (Urosevic and Dummer, 2003). Daneben fördert IL-10 die Proliferation und inhibiert die Apoptose von Tumorzellen (Alas et al., 2001; Sredni et al., 2004). Ein durch IL-10 gesteigertes Tumorwachstum von B16 Melanomen durch autokrine Stimulation konnte auch *in vivo* beobachtet werden. In demselben Tumormodell förderte IL-10 die Angiogenese, reduzierte die Nekrose des Tumors und inhibierte die Aktivität von Makrophagen (Garcia-Hernandez et al., 2002). Weiterhin kann IL-10 die Aggressivität von Lungenadenokarzinomen fördern (Sung et al., 2013). In präklinischen Studien wurde gezeigt, dass die Behandlung von Tumoren mit Antikörpern gegen IL-10 oder den IL-10 Rezeptor eine Steigerung der Anti-Tumor-Antwort, sowie die Abstoßung der Tumoren zur Folge hatte (Jovasevic et al., 2004; Vicari et al., 2002). Nichtsdestotrotz wurde in vielen Studien auch eine Anti-Tumor-Wirksamkeit von IL-10 beschrieben. Beispielsweise führte der Gentransfer von IL-10 in murinen Karzinom- und Melanomzelllinien zum Verlust der Tumorigenität, steigerte die Anti-Tumor-Immunantwort und induzierte sogar eine T-Zell-vermittelte Abstoßung des Tumors im Tiermodell (Adris et al., 1999; Gerard et al., 1996; Giovarelli et al., 1995). Dies wurde auf die Aktivierung von T-Zellen (CTLs), sowie NK-Zellen und Neutrophilen zurückgeführt. Ähnliches wurde nach der systemischen Verabreichung von IL-10 in Tumor tragenden Mäusen gezeigt. So induzierte IL-10 die Expression von IFN- γ in intratumoralen CD8⁺ T-Zellen und führte auch hier zur T-Zell-abhängigen Abstoßung von Brustkrebstumoren (Emmerich et al., 2012). Die Behandlung löste außerdem einen Vakzinierungseffekt aus, der sich in der Abstoßung erneut implantierter Tumorzellen äußerte. IL-10-defiziente Mäuse neigten eher zur Bildung von chemisch-induziertem Hautkrebs und zur frühzeitigen Bildung von Metastasen (Mumm et al., 2011). Zudem wiesen diese Mäuse eine niedrigere Anzahl an intratumoralen CD8⁺ T-Zellen, MHC-Molekülen und Granzymen im Vergleich zu IL-10-exprimierenden Tieren auf. In *in vivo* Studien wurde die durch IL-10 unterbundene Metastasenbildung auf eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität in Melanom- und Brustkrebs-Modellen zurückgeführt (Kundu et al., 1996; Zheng et al., 1996).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des immunregulatorischen Zytokins IL-10 für das Wachstum und die Funktion von NK-Zellen und für deren Interaktion mit anderen Immunzellen besser zu verstehen. Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* gezeigt, dass CAR NK-92 Zellen nach Kontakt mit Antigen-positiven Tumorzellen neben pro-inflammatorischen Zytokinen auch große Mengen von IL-10 ausschütten (Genssler et al., 2016; Nowakowska et al., 2018; Oelsner et al., 2017; Schonfeld et al., 2015). Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass IL-10 pro-inflammatorischen Zytokinen entgegen wirkt, und die endogene Anti-Tumor-Immunantwort dämpft (Mittal and Roche, 2015). Im Widerspruch dazu stehen die beobachteten stimulatorischen Effekte, die IL-10 auf die Proliferation und Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen ausüben kann (Emmerich et al., 2012; Mocellin et al., 2003). Somit ist auf Grundlage der derzeitigen Literatur noch unklar, welche Einflüsse das von NK-Zellen sekretierte IL-10 im Tumormikromilieu genau hat. Unter Nutzung der humanen NK-Zelllinie NK-92 und der von diesen Zellen abgeleiteten CAR Effektorzelllinie NK-92/5.28.z als klinisch relevante Modelle für die adoptive Immuntherapie wurden daher Ansätze entwickelt, um die Sekretion von IL-10 durch NK-Zellen gezielt zu unterbinden oder die Aktivität des sezernierten IL-10 zu hemmen.

In der Krebstherapie häufig zum Einsatz kommende Therapeutika sind monoklonale Antikörper, die ihr Zielmolekül mit hoher Spezifität erkennen und blockieren können. Um die Aktivität von IL-10 gezielt zu neutralisieren, wurde ein tetravalenter anti-IL-10 Mini-Antikörper mit vier IL-10 Bindestellen generiert. Daneben wurden weitere Ansätze entwickelt, um IL-10 direkt in NK-92 Zellen zu depletieren. Diese beinhalten eine shRNA-vermittelte Herunterregulation der IL-10 Expression auf mRNA-Ebene, einen CRISPR/Cas9-vermittelten IL-10 Gen-*knockout* auf DNA-Ebene und einen *knockdown* der IL-10 Sekretion auf Protein-Ebene mittels intrazellulär exprimierter anti-IL-10 scFv-Antikörper (Intrabodies). Intrabodies sind Antikörpermoleküle, die als rekombinante Proteine intrazellulär exprimiert werden und über angefügte Signalsequenzen in bestimmte subzelluläre Kompartimente dirigiert werden (Kontermann, 2004). So können Intrabodies beispielsweise im endoplasmatischen Retikulum (ER) verbleiben und dort ihr Zielmolekül nach Bindung zurückhalten (Beerli et al., 1994b). Die am häufigsten genutzte Struktur eines Intrabodies ist ein scFv-Antikörperfragment, das aus den Antigen-erkennenden variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten Kette (V_L) eines monoklonalen Antikörpers besteht, die über einen Peptidlinker kovalent miteinander verbunden sind.

Die mit der Reduktion der IL-10 Produktion oder Aktivität verbundenen Effekte auf das Wachstum, die natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität, sowie die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine von parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen wurden ebenso analysiert, wie die Auswirkungen auf die Reifung und Polarisierung ko-kultivierter

dendritischer Zellen und Makrophagen. Bei den genannten Zelltypen handelt es sich um Antigen-präsentierende Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Tumorspezifischen adaptiven Immunantwort spielen. Da es *in vitro* nicht möglich ist, die komplexen Vorgänge im lebenden Organismus nachzubilden, wurde zudem in einem immunkompetenten Mausmodell untersucht, ob die Hemmung der IL-10 Sekretion einen Einfluss auf die *in vivo* Anti-Tumor-Aktivität von ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen hat.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Apparaturen

In der nachfolgenden Tabelle sind alle Laborgeräte und Apparaturen, die in dieser Doktorarbeit genutzt wurden, aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete Laborgeräte und Apparaturen

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	FVS2 + UWK 20.0 Fedegari
Blottingapparatur	Fröbel Labortechnik (Wasserburg)
Brutschränke	Zellkultur-Inkubator: Integra Biosciences (Fernwald) Bakterien-Inkubator: Heraeus
Durchflusszytometer	FACSAria FACSCalibur FACSCanto II LSRFortessa } BD Biosciences (Heidelberg)
Elektrophoresekammern	Agarosegele: BioRad (München) SDS-Page: BioRad (München)
Elektroporator	BioRad (München)
Gefrierschränke	-20°C: Liebherr (Biberach) -80°C: New Brunswick/Eppendorf (Hamburg)
Geldokumentationssystem	Fusion Fx7: Peqlab (Erlangen)
Heizblock	Techne (Dexford-Cambridge, United Kingdom)
Inkubationsschüttler	Multitron: Infors (Bottmingen, Schweiz)
Kühlschränke	Liebherr (Biberach)
Magnetrührer	IKA Mag RCT (Staufen)
Mikroskope	Nikon TMS: Nikon (Düsseldorf) Axiovert 25: Zeiss (Oberkochen)
Mikrowelle	Mikromat: AEG (Nürnberg)
Netzgeräte	Power Pac 300: BioRad (München) ECPS 3000/150: Pharmacia (Uppsala, Schweden)
PCR-Maschine	Biometra® T3000 Thermocycler RT-PCR: Biometra GmbH (Göttingen) LightCycler® 480: Roche (Basel, Schweiz)
pH-Meter	MP 220: Mettler Toledo (Gießen)
Pipetten und Pipettierhilfe	P2, P20, P200, P1000 Pipetten: Gilson (Limburg-Offheim)

Pipetboy acu:	Integra Biosciences (Fernwald)
Rollenmischer	RM5-30V: CAT/M. Zipperer GmbH (Staufen)
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	XR 24 Pro: Dürr Dental (Bietigheim-Bissingen)
Sonifikator	Bioruptor: Diagenode (Seraing, Belgien)
Spektrophotometer	Anthos Reader 2001: Anthos Labtec Instruments GmbH (Salzburg, Österreich)
	Evolution 60: Thermo Scientific (Darmstadt)
	Nanodrop 1000: Thermo Scientific (Darmstadt)
Sterilbank	Zellkultursterilbank: CleanAir (de Waal Malefyt et al.)
	Bakterien-Sterilbank: Ceag Schirp (Bork)
Vortex-Gerät	Vortex-Genie 2: Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waage	Explorer: Ohaus (Greifensee, Schweiz)
Wasseraufbereitungsanlage	Elix: Millipore (Schwalbach)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen	Avanti™ J-25: Beckmann Coulter (Krefeld)
	Biofuge pico: Heraeus (Hanau)
	Megafuge 1.0R: Heraeus (Hanau)
	Mikro 22R: Hettich (Tuttlingen)
	Rotina 46 R: Hettich (Tuttlingen)
	Z 160M: Hermle (Gosheim)

2.2 Verbrauchsmaterialien

In Tab. 2 sind die Verbrauchsmaterialien, die für die Durchführung der Experimente essentiell waren, aufgelistet.

Tab. 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Autoradiographie-Film	Super RX; Fujifilm Europe (Düsseldorf)
Diverse Plastikwaren	Corning (Schiphol-Rijk, Niederlande), Greiner Bio-One (Frickenhausen), BD Biosciences (Heidelberg), Sarstedt (Nümbrecht), Corning (Amsterdam, Niederlande), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen	Fisher Scientific (Hampton, USA)
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Immobilon P: GE Healthcare (Freiburg)
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Merck Millipore (Darmstadt)

Whatman Filterpapier

Carl Roth (Karlsruhe)

Zählkammer

KOVA® GLASSTIC® Slide 10: Kova International
(Amsterdam, Niederlande)

2.3 Chemikalien und Reagenzien

In Tab. 3 sind die in dieser Arbeit genutzten Chemikalien und Reagenzien aufgelistet. Weitere Reagenzien sind in der nachfolgenden Sektion (Methoden) an entsprechender Stelle vermerkt.

Tab. 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin	InvivoGen Europe (Toulouse, Frankreich)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	InvivoGen Europe (Toulouse, Frankreich)
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magermilchpulver	Fluka® Analytica (München)
Natriumdodecylsulfat (<i>sodium lauryl sulfate</i> , SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Polybren	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Prostaglandin E2 (PGE2)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
TWEEN® 20	Carl Roth (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.4 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tab. 4 aufgeführt. Dabei wurden alle wässrigen Pufferlösungen mit zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Weitere Puffer und Lösungen sind in der nachfolgenden Sektion (Methoden) an entsprechender Stelle beschrieben.

Tab. 4: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung/Hersteller
CutSmart® Puffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
DNA-Ladepuffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

DPBS (Dulbecco's <i>phosphate-buffered saline</i>) 1x	PAA, Gibco
TBST (<i>tris-buffered saline</i> -Tween 20) 1x	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,1% [v/v] TWEEN 20, pH 7,5
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE) 1x	1 mM EDTA, 40 mM Tris, pH 8,0 eingestellt mit Eisessig
0,4% Trypanblau-Lösung	Gibco
0,05% Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Gibco

2.5 Rekombinante Proteine

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit genutzten rekombinanten Proteine in Tab. 5 aufgelistet. Kommerziell erhältliche Proteine wurden als Lyophilisate geliefert, welche nach Herstellerangaben in zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) oder in 1x DPBS, gegebenenfalls mit 0,1%igen BSA versetzt, gelöst wurden.

Tab. 5: Verwendete rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Hersteller
IFN- γ (humanes)	PeproTech GmbH (Hamburg)
IFN- γ (murines)	PeproTech GmbH (Hamburg)
IgG4-Fc	Sino Biological Inc. (Peking, China)
IL-1 β	PeproTech GmbH (Hamburg)
IL-2 (Proleukin® S)	Novartis Pharma GmbH (Nürnberg)
IL-4	PeproTech GmbH (Hamburg)
IL-6	PeproTech GmbH (Hamburg)
IL-10	PeproTech GmbH (Hamburg)
IL-10MH	In dieser Arbeitsgruppe generiert; trägt C-terminal ein Myc-Tag (M) und ein His-Tag (H)
GM-CSF	PeproTech GmbH (Hamburg)
TNF- α	PeproTech GmbH (Hamburg)

2.6 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, sowie Isotypenkontrollen sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 6) aufgeführt.

Tab. 6: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper, sowie Isotypenkontrollen. Gelistet sind diese mit Klonbezeichnung, Spezies, eventuell gekoppeltem Fluorochrom, sowie Hersteller, eingesetzter Konzentration und Verwendung in der Durchflusszytometrie (*flow cytometry*, Fc) oder im Immunoblot (IB). AF: Alexa Fluor, APC: Allophycocyanin, BV: Brilliant™ Violet, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, HRP: *horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase, PE: Phycoerythrin, k.A.: keine Angaben.

Zielantigen	Klon/ Spezies	Markierung	Hersteller	Eingesetzte Konzentration	Verwen- dung
<u>Primärantikörper:</u>					
BiP	C50B12 Kaninchen	-	Cell Signaling	1:1000	IB
CD8-α	H-160 Kaninchen	-	Santa Cruz	1:500	IB
CD11b	M1/70.15.11.5 Ratte	PE	Miltenyi Biotec	2 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
CD11c	B-ly6 Maus	BV711	BD Biosciences	2,5 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
CD14	MφP9 Maus	APC-H7	BD Biosciences	2,5 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
CD14	MφP9 Maus	PE	BD Biosciences	1,25 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
CD40	5C3 Maus	FITC	BD Biosciences	10 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
CD45	HI30 Maus	V500	BD Biosciences	1,25 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
CD80	L307.4 Maus	PE	BD Biosciences	10 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
CD83	HB15e Maus	BV711	BD Biosciences	1 µl auf 2,5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
CD86	2331 FUN-1 Maus	APC	BD Biosciences	10 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
CD163	GHI/61 Maus	FITC	BD Biosciences	2,5 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc

					Material
CD210a	3F9 Ratte	PE	BD Biosciences	20 µl auf 1 x 10 ⁶ Zellen	Fc
CD340	24D2 Maus	AF647	Biolegend	1 µl auf 2,5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
eIF2α	D7D3 Kaninchen	-	Cell Signaling	1:1000	IB
H-2D ^b	KH95 Maus	APC	Biolegend	0,5 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
HLA-DR	G46-6 Maus	BV510	BD Biosciences	2,5 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
HA-Tag	6E2 Maus	-	Cell Signaling	1:1000	Fc
IL-10	k.A. Kaninchen	-	PeproTech	1:5000	WB
p-STAT3 (Tyr705)	D3A7 Kaninchen	-	Cell Signaling	1:1000	IB
p-eIF2α (Ser51)	k.A. Kaninchen	-	Cell Signaling	1:1000	IB
PD-L1	29E.2A3 Maus	PE-Cy7	Biolegend	1 µl auf 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
STAT3	D3Z2G Kaninchen	-	Cell Signaling	1:1000	IB
γ-Tubulin	k.A. Kaninchen	-	Sigma	1:2000	Fc

Sekundärantikörper und Isotypenkontrollen

Human IgG	Ziege	APC	Jackson ImmunoResearch	0,25 µg für 5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
Kaninchen-IgG	Ziege	HRP	Sigma-Aldrich	1:16000	IB
Maus-IgG	Ziege	APC	Jackson ImmunoResearch	0,25 µg für 2,5 x 10 ⁵ Zellen	Fc
Maus-IgG	Ziege	HRP	Sigma-Aldrich	1:13000	IB
Maus-IgG1k	MOPC-21 Maus	AF647	BD Biosciences	5 µl auf 1 x 10 ⁶ Zellen	Fc

Ratten- IgG2a, κ	R35-95 Maus	PE	BD Biosciences	20 μ l auf 1×10^6 Zellen	Fc
Maus- IgG2b, κ	MPC-11 Maus	APC	Biolegend	0,5 μ l auf 5×10^5 Zellen	Fc

2.7 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und generierten Plasmide sind in Tab. 7 beschrieben.

Tab. 7: In dieser Arbeit generierte und verwendete Plasmide. CMV: Cytomegalievirus, IRES: *internal ribosome entry site*, SFFV: *spleen focus-forming virus*, EGFP: *enhanced green fluorescent protein*, ER: Endoplasmatisches Retikulum, tGFP: *turbo green fluorescent protein*.

Bezeichnung	Eigenschaft	Referenz
pCMV_ Δ R8.91	Lentivirales Verpackungsplasmid; abgeleitet von HIV-1, welches für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, wie auch für die Reverse Transkriptase, Integrase und Protease (pol) kodiert.	(Zufferey et al., 1997)
pMD2.G	Lentivirales Verpackungsplasmid, welches das <i>vesicular stomatitis</i> Virus Hüllprotein G (VSV-G) kodiert.	(Zufferey et al., 1997)
pGIPZ-IL-10-shRNA	Lentivirales Transferplasmid kodierend für eine IL-10 mRNA spezifische shRNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Weiterhin kodiert das Plasmid für eine tGFP cDNA, eine IRES und für die Sequenz des Puromycin-Resistenzgens Puromycin-N-Acetyltransferase.	Thermo Fisher Scientific
pGIPZ-Ctrl-shRNA	Lentivirales Transferplasmid kodierend für eine shRNA, die keine Komplementarität zu einer existierenden humanen mRNA besitzt und als Kontrolle dient (Kontroll-shRNA, <i>Control (Ctrl)</i> -shRNA). Die Expression wird vom CMV-Promotor getrieben. Weiterhin kodiert das Plasmid für eine tGFP cDNA, eine IRES und für die Sequenz der Puromycin-N-Acetyltransferase.	Thermo Fisher Scientific
pLentiCRISPRv2-GFP-Puro-IL-10	Lentivirales Transferplasmid kodierend für eine IL-10-spezifische gRNA unter der Kontrolle des U6-Promotors. Weiterhin kodiert das Plasmid für die Endonuklease Cas9, dessen Expression unter der Kontrolle des EF-1 α core Promotors steht. Dem folgt die Sequenz des FLAG-Tag, eine T2A-Sequenz, die cDNA für EGFP, eine P2A-Sequenz und die cDNA für die Puromycin-N-Acetyltransferase.	Manuel Kaulich

pLentiCRISPRv2-GFP-Puro	Lentivirales Transferplasmid kodierend für die Endonuklease Cas9 unter der Kontrolle des EF-1 α core Promotors, gefolgt von der Sequenz des FLAG-Tag, einer T2A-Sequenz, der EGFP cDNA, einer P2A-Sequenz und der cDNA für die Puromycin-N-Acetyltransferase.	Manuel Kaulich
pMK- α IL-10TM	Klonierungsplasmid von GeneArt; enthält die kodonoptimierte DNA-Sequenz für das anti-IL-10 Antikörperfragment, welches in der Zellmembran durch eine Transmembrandomäne verankert ist (α IL-10TM).	diese Arbeit
pS- α IL-10ER-IEW	Lentivirales Transferplasmid kodierend für das anti-IL-10 Antikörperfragment, welches im ER durch die Aminosäuresequenz KDEL zurückgehalten wird (α IL-10ER). Die Expression steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und der EGFP cDNA.	diese Arbeit
pS- α IL-10S-IEW	Lentivirales Transferplasmid kodierend für das sekretierte anti-IL-10 Antikörperfragment (α IL-10S) unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und der EGFP cDNA.	diese Arbeit
pS- α IL-10TM-IEW	Lentivirales Transferplasmid kodierend für das anti-IL-10 Antikörperfragment, welches in der Zellmembran durch eine Transmembrandomäne verankert ist (α IL-10TM). Die Expression steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und der EGFP cDNA.	diese Arbeit
pS-IL-10TM-IEW	Lentivirales Transferplasmid kodierend für IL-10, welches in der Zellmembran durch eine Transmembrandomäne verankert ist. Die Expression steht unter der Kontrolle des SFFV-Promotors, gefolgt von einer IRES und der EGFP cDNA.	diese Arbeit
pcDNA3-BT-063-IgG4-Fc-BT-063	Eukaryotisches Expressionsplasmid kodierend für den anti-IL-10 Mini-Antikörper unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das Fusionsprotein besitzt am N- und C-Terminus das scFv-Antikörperfragment des Antikörpers BT-063, welche über eine IgG4-Fc Sequenz miteinander verknüpft sind.	Nina Müller, unveröffentlicht

2.8 Oligonukleotide

Nachfolgend sind in Tab. 8 die verwendeten Oligonukleotide mit ihrer Sequenz in 5'-3' Orientierung und ihrer Anwendung aufgelistet. Die shRNAs wurden von der Firma GE Healthcare (Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) bestellt, wohingegen alle weiteren Oligonukleotide von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert wurden.

Tab. 8: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Orientierung	Verwendung
β2M F	ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA	vorwärts	Quantitative Echtzeit-PCR; Amplifizierung der humanen β2-Mikroglobulin (β2M) cDNA
β2M R	GGCATCTTCAAACCTCCATG	rückwärts	
BPK 6	GCTTCTGCTTCCCGAGCTC	vorwärts	Sequenzierung von pSIEW-Konstrukten; bindet im SFFV-Promotor
BPK 7rc	CACACCGGCCTTATTCCAAG	rückwärts	Sequenzierung von pSIEW-Konstrukten; bindet in der IRES
Ctrl-shRNA	CTCGCTTGGGCGAGAGTAA	vorwärts	RNA-Interferenz, Kontroll-shRNA (<i>Control (Ctrl)</i> -shRNA); besitzt keine Komplementarität zu einer existierenden humanen mRNA
gRNA 1	GTGAGGGCCAGCCCAGGCCA	vorwärts	Teil des CRISPR/Cas9-Systems zur Induktion eines vollständigen IL-10 Gen- <i>knockouts</i> ; Zielsequenz befindet sich im Exon 1
	TGGCCTGGGCTGGCCCTCAC	rückwärts	
gRNA 2	TCAGGCTGAGGCTACGGCGC	vorwärts	Teil des CRISPR/Cas9-Systems zur Induktion eines vollständigen IL-10 Gen- <i>knockouts</i> ; Zielsequenz befindet sich im Exon 3
	GCGCCGTAGCCTCAGCCTGA	rückwärts	

gRNA 3	GGCGCATGTGAACTCCCTGG CCAGGGAGTTCACATGCGCC	vorwärts rückwärts	Teil des CRISPR/Cas9- Systems zur Induktion eines vollständigen IL-10 Gen- <i>knockouts</i> ; Zielsequenz befindet sich im Exon 3
gRNA 4	TGAAAACAAGAGCAAGGCCG CGGCCTTGCTCTTGTTTTCA	vorwärts rückwärts	Teil des CRISPR/Cas9- Systems zur Induktion eines vollständigen IL-10 Gen- <i>knockouts</i> ; Zielsequenz befindet sich im Exon 5
IL-10 F	AAGACCCAGACATCAAGGCG	vorwärts	Quantitative Echtzeit- PCR; Amplifizierung der humanen IL-10 cDNA
IL-10 R	CACGGCCTTGCTCTTGTTTT	rückwärts	
IL-10- shRNA	UUCGUAUCUUCAUUGUCAU	vorwärts	RNA-Interferenz, bindet IL-10 mRNA
Oligo-dT	TTTTTTTTTTTTTTT	vorwärts	cDNA-Synthese

2.9 Bakterienstämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Plasmid-Klonierungen wurden ausschließlich *E. coli*-Bakterienstämme verwendet.

Tab. 9: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, lac ⁻ , F'(traD36 proAB ⁺ , lacI ^q , lacZΔM15)	(Hanahan, 1983)

2.10 Bakterienmedien und Antibiotika

Luria Bertani (LB)-Flüssigmedien und LB-Agar wurden zunächst bei 121°C und einem Dampfdruck von 180 - 200 kPa für 20 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C wurde das gewünschte Antibiotikum zugesetzt.

Tab. 10: Verwendete Bakterienmedien und Antibiotika

Bezeichnung	Zusammensetzung
Luria Bertani (LB)-Medium	5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Trypton gelöst in 1 l ddH ₂ O
LB-Ampicillin-Medium	LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin
LB-Kanamycin-Medium	LB-Medium 50 µg/ml Kanamycin
LB-Ampicillin-Agar	LB-Medium 1,5% [w/v] Agar-Agar 100 µg/ml Ampicillin
LB-Kanamycin-Agar	LB-Medium 1,5% [w/v] Agar-Agar 50 µg/ml Kanamycin

2.11 Zellkulturmedien und Zusätze

Für das Arbeiten mit diversen eukaryotischen Zellen wurden die nachfolgend aufgeführten Zellkulturmedien und Zusätze verwendet (Tab. 11).

Tab. 11: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
DMEM ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen)	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco) 10% [v/v] FBS (Hitze-inaktiviert) 2 mM L-Glutamin 1% [v/v] Penicillin/Streptomycin (100 x)
Einfriermedium NK-92	10% [v/v] DMSO in humanem Plasma
Einfriermedium Tumorzellen	10% [v/v] DMSO in FBS

FBS (<i>fetal bovine serum</i>)	PAA, Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund)
L-Glutamin	PAA, Gibco
Humanes Plasma	DRK (Deutsches Rotes Kreuz)-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen
IL-2	Proleukin® S (Novartis Pharma)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	PAA, Gibco
Puromycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
RPMI ⁺⁺⁺ (mit Zusätzen)	RPMI 1640 (Gibco) 10% [v/v] FBS (Hitze-inaktiviert) 2 mM [v/v] L-Glutamin 1% [v/v] Penicillin/Streptomycin 100x
X-VIVO ⁺⁺ (mit Zusätzen)	X-VIVO 10 (Lonza, Basel, Schweiz) 5% [v/v] humanes Plasma (Hitze-inaktiviert) 100 IU/ml IL-2

2.12 Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen

In dieser Arbeit wurden etablierte humane und murine Zelllinien verwendet, die in Tab. 12 aufgelistet sind. Daneben wurden auch Primärzellen (Monozyten-abgeleitete Makrophagen und dendritische Zellen) eingesetzt, deren Kulturbedingungen im nächsten Abschnitt (Methoden) näher beschrieben sind.

Tab. 12: Verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen. In dieser Arbeit kamen diverse humane und murine Zelllinien zum Einsatz. DMEM⁺⁺⁺/RPMI⁺⁺⁺: DMEM, sowie RPMI liegen supplementiert mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS), 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin, sowie 100 µg/ml Streptomycin vor. X-VIVO⁺⁺: X-VIVO10 Medium, supplementiert mit 100 IU/ml IL-2 und 5% Hitze-inaktiviertem humanem Plasma.

Zelllinie	Beschreibung	Kultur-medium	Referenz/ ATCC-Nr.
B16-F10	Murines Melanom	DMEM ⁺⁺⁺	CRL-6475
B16-F10/ErbB2	Murines Melanom, exprimiert humanes ErbB2	DMEM ⁺⁺⁺	(Pegram et al., 2008)
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM ⁺⁺⁺	CRL-1573
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen; exprimieren das große T-Antigen von SV40	DMEM ⁺⁺⁺	CRL-11268

K562	Humane chronische myeloische Leukämie	RPMI ⁺⁺⁺	CCL-243
K562/IL-10TM	Humane chronische myeloische Leukämie; exprimiert eine membranständige Version von IL-10	RPMI ⁺⁺⁺	diese Arbeit
MDA-MB453	Humanes Mammakarzinom	DMEM ⁺⁺⁺	HTB-131
MDA-MB468	Humanes Mammakarzinom	DMEM ⁺⁺⁺	HTB-132
NK-92	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom	X-VIVO ⁺⁺	CRL-2407
NK-92/Ctrl-shRNA	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert eine Kontroll-shRNA (<i>Control (Ctrl)</i> -shRNA)	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/IL-10-shRNA	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert eine shRNA, welche gegen die IL-10 mRNA gerichtet ist	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/ α IL-10ER	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert die im ER zurückgehaltene Form eines anti-IL-10 scFv-Antikörperfragments	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/ α IL-10S	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert eine sekretierte Form eines anti-IL-10 scFv-Antikörperfragments	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/ α IL-10TM	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert eine transmembrane Form eines anti-IL-10 scFv-Antikörperfragments	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/Cas9	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert die Endonuklease Cas9	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit

NK-92/IL-10-CRISPR/Cas9	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert die Endonuklease Cas9 und eine gegen das IL-10 Gen gerichtete gRNA	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/5.28.z	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den CAR 5.28.z	X-VIVO ⁺⁺	(Schonfeld et al., 2015)
NK-92/5.28.z/Ctrl-shRNA	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den CAR 5.28.z und eine Kontroll-shRNA (<i>Control (Ctrl)</i> -shRNA)	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/5.28.z/IL-10-shRNA	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den CAR 5.28.z und eine shRNA, die gegen die IL-10 mRNA gerichtet ist	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/5.28.z/ α IL-10ER	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den CAR 5.28.z und die im ER zurückgehaltene Form eines anti-IL-10 scFv-Antikörperfragments	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/5.28.z/ α IL-10S	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den CAR 5.28.z und eine sekretierte Form eines anti-IL-10 scFv-Antikörperfragments	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/5.28.z/ α IL-10TM	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den CAR 5.28.z und eine transmembrane Form eines anti-IL-10 scFv-Antikörperfragments	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
NK-92/5.28.z/Cas9	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den CAR	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit

	5.28.z und die Endonuklease Cas9		
NK-92/5.28.z/IL-10-CRISPR/Cas9	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; exprimiert den CAR	X-VIVO ⁺⁺	diese Arbeit
	5.28.z, die Endonuklease Cas9 und eine gegen das IL-10 Gen gerichtete gRNA		

2.13 Mausstamm

Das *in vivo* Experiment wurde in C57BL/6N Albino Mäusen mit dem Genotyp B6N-Tyr^{c-}^{Brd}/BrdCrCrl durchgeführt, welche von Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

10x Reaktionspuffer	500 mM Tris-HCl (pH 8,3)
	750 mM KCl
	30 mM MgCl ₂
	100 mM DTT
	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
dNTPs	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
<i>RiboLock</i> TM RNase Inhibitor (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/μl)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Die Gesamt-RNA aus NK-92 Zellen wurde mit Hilfe des *RNeasy® Plus Mini Kit* (Qiagen) gemäß Herstellerangaben extrahiert. Um genomische DNA aus dem Lysat zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau unter Einsatz des *RNase-Free DNase Sets* (enthält RNase-freie DNase I, RNase-freien Puffer RDD und RNase-freies Wasser, Qiagen) durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch gemessen (3.1.10).

Anschließend wurde die mRNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben, welche für weitere Analysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR (3.1.3) verwendet wurde. Dazu wurde 1 μg der extrahierten Gesamt-RNA mit 2 μl Oligo-dT Primer (40 μM) und 4 μl dNTPs (ATP, GTP, CTP, TTP je 2,5 mM) versetzt. Das Volumen wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 16 μl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation von 4 min bei 70°C. Anschließend wurden die Proben kurz anzentrifugiert, auf Eis gelagert und mit folgenden Komponenten versetzt:

Tab. 13: Reaktionsansatz für eine cDNA-Synthese

Komponente	Menge [μl]
10x Reaktionspuffer	2
<i>RiboLock</i> TM RNase Inhibitor (10 U/μl)	1
M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/μl)	1

Es folgte eine Inkubation bei 42°C für 1 h mit anschließender 10-minütiger Enzym-Inaktivierung bei 90°C. Die cDNA wurde entweder bei -20°C gelagert oder direkt zur Analyse verwendet.

3.1.2 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion

Q5 Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Q5 Reaktionspuffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist es möglich, Vervielfältigungen und genspezifische Analysen von DNA-Sequenzen durch die Verwendung ausgewählter Primer durchzuführen. Die Reaktionen wurden mit den nachfolgenden Komponenten durchgeführt.

Tab. 14: Reaktionsansatz für eine PCR-Reaktion

Komponente	Menge
DNA-Template	50 - 100 ng
dNTPs (ATP, GTP, CTP, TTP je 10 mM)	1 µl
5x Q5 Reaktionspuffer	5 µl
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	1 µl
<i>Reverse</i> -Primer (10 µM)	1 µl
Q5-Polymerase (2000 U/ml)	0,5 µl
Auf 50 µl mit ddH ₂ O auffüllen	

Weiterhin wurde eine Negativ-Kontrolle in Form einer Wasserkontrolle mitgeführt, um Verunreinigungen ausschließen zu können. Die Amplifizierung wurde im *Biometra® T3000 Thermocycler* mit folgendem Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung (98°C, 2 min), gefolgt von Denaturierung (98°C, 10 s), Hybridisierung (Temperatur: Primer-spezifisch, 30 s), Elongation (72°C, 30 s) und finaler Elongation (72°C, 4 min). Die Anzahl der Zyklen bei der Amplifizierung war von dem jeweiligen Primerpaar abhängig und betrug 16 - 25 Zyklen. Die Hybridisierungstemperatur (T_H) der Primer wurde wie folgt berechnet:

$$T_H [^{\circ}\text{C}] = \frac{20}{n_{\text{total}}} \times [2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C)] - 5$$

Hierbei entspricht n_{total} der Gesamtzahl der hybridisierenden Nukleotide, n_A , n_T , n_G und n_C repräsentieren die entsprechende Anzahl jeder Base im Oligonukleotid.

Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Analyse erfolgte anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5).

3.1.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Mesa Green qPCR MasterMix Plus
(SYBR Green-Mix)

2x Reaktionspuffer; enthält dNTPs, die Meteor Taq DNA Polymerase, $MgCl_2$, SYBR® Green I, Stabilisatoren und Fluorescein (Eurogentec, Lüttich, Belgien)

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR, *real-time quantitative PCR*) kann die Vervielfältigung der DNA-Sequenzen über Fluoreszenzsignale in Echtzeit verfolgt und quantitativ analysiert werden. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur Menge der amplifizierten DNA-Sequenz zu. Zu den Detektionsmethoden gehören beispielsweise die sequenzspezifischen fluoreszenzmarkierten Sonden und der sequenzunspezifische Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde. Der Farbstoff bindet in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA, was zur Bildung von DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexen führt. Diese absorbieren blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{max}=497$ nm und emittieren grünes Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda_{max}=520$ nm. Die qPCR-Ansätze wurden in Triplikaten in eine 96-well Platte pipettiert. Die genutzten Komponenten mit der Volumenangabe pro Ansatz sind in Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 15: Reaktionsansatz für eine qPCR-Reaktion

Komponente	Menge [μ l]
cDNA	2 (aus 3.1.1, 1:1 verdünnt)
<i>Forward</i> -Primer (10 μ M)	0,25
<i>Reverse</i> -Primer (10 μ M)	0,25
SYBR Green-Mix	12,5
ddH ₂ O	10
Gesamtvolumen: 25 μ l	

Nach Vorlage der Reaktionen wurde die Platte bei 1000 x g für 1 min zentrifugiert und im LightCycler® 480 mit folgendem Programm gemessen: Nach einer initialen Denaturierung (95°C, 5 min) folgten 50 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C, 20 s), Hybridisierung (58°C, 20 s), Elongation (72°C, 25 s) und Messung des SYBR® Green I Signals (78°C, 1 s). Um festzustellen, ob nur ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde, wurde am Ende der Reaktion eine Schmelzkurve aufgenommen. Diesbezüglich besitzen Primerdimere einen geringeren Schmelzpunkt als spezifisch amplifizierte PCR-Produkte. Die amplifizierte DNA wird durch die kontinuierliche Erhöhung der Temperatur von 65-97°C aufgeschmolzen. Dabei

wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt, sodass die Fluoreszenzabnahme gemessen werden kann. Dazu wurden 5 Messungen pro 1°C aufgenommen. Kontrollen ohne cDNA wurden ebenfalls mitgeführt. Die mRNA-Expression wurde über die $\Delta\Delta CT$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) berechnet. Zur Normalisierung wurde das Referenzgen $\beta 2$ -Mikroglobulin (B2M) mitgeführt. Die relative mRNA-Expression nicht aktivierter Zellen oder stimulierter, unmodifizierter Zellen wurde als 1 gesetzt und die Werte aktivierter oder stimulierter, shRNA-exprimierender Zellen relativ dazu berechnet.

3.1.4 Restriktion von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA

Calf Intestinal Phosphatase (CIP)

New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Um DNA-Fragmente in die gewünschte Plasmid-DNA zu klonieren, wurde zunächst eine präparative Restriktion mit geeigneten Restriktionsnukleasen durchgeführt. Dazu wurden 3 μ g DNA-Fragmente oder Plasmid-DNA in 20 μ l Gesamtvolumen mit einer oder bei einem Doppelverdau mit zwei Restriktionsnukleasen (5 U) für 3 h bei 37°C unter optimalen vom Hersteller vorgegebenen Reaktionsbedingungen verdaut. Um später eine effiziente Ligation zwischen Fragment und Plasmidrückgrat zu gewährleisten, wurde 30 min vor Beendigung des Verdaus 1 U der *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP) zum Plasmidrückgrat hinzugegeben und weiterhin bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase entfernt die 5'-Phosphatgruppen an den Enden des verdauten Plasmidrückgrates und verringert damit die Wahrscheinlichkeit einer Religation von linearisierten Plasmiden bei Abwesenheit des zu inserierenden DNA-Fragments. Sowohl das Fragment, also auch das Plasmidrückgrat wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und aus dem Gel isoliert.

3.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Größenstandards

1 kb plus Marker

100 bp plus Marker

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

DNA-Ladepuffer (6x)

Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Die Auftrennung der verdauten DNA oder der PCR-Produkte erfolgte entsprechend ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden die DNA-Proben zu 1/6 Volumenanteil mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel, versetzt mit Ethidiumbromid (1:10 000), aufgetragen. Weiterhin wurden 6 μ l eines DNA-Größenstandards mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Horizontal-Gelkammer in 1x TAE-Puffer bei

einer konstanten Spannung von 100 V. Die Detektion der Banden wurde unter UV-Licht mit einem Fusion Fx7 Geldokumentationssystem realisiert und wurde fotografisch dokumentiert.

3.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die nachfolgende Ligation wurden die verdauten DNA-Fragmente und Plasmidrückgrate gewünschter Größe zunächst mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des *peqGOLD® Gel Extraction Kits* (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Herstellerprotokoll aus dem Gelstück isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der eluierten DNA erfolgte am UV/Vis-Spektrometer (NanoDrop 1000).

3.1.7 DNA-Ligation

T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
T4 DNA-Ligase-Puffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Nach der Aufreinigung der DNA-Fragmente und der Plasmidrückgrate erfolgte die Ligation unter Anwesenheit der T4 DNA-Ligase unter optimalen Reaktionsbedingungen. Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Phosphodiesterbildung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe des Plasmidrückgrates und des Fragments. Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl in einem molaren Verhältnis von 10:1 von Plasmid-DNA zu DNA-Fragment bei 16°C über Nacht im Wasserbad durchgeführt. Die dabei einzusetzenden DNA-Mengen wurden anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Menge Insert [ng]} = \text{Molares Verhältnis} \times \frac{\text{Länge Insert [bp]} \times \text{Menge Vektor [ng]}}{\text{Länge Vektor [bp]}}$$

Weiterhin wurde eine Religationskontrolle, welche nur das Plasmidrückgrat und kein DNA-Fragment enthielt, mitgeführt. Die Ligationsansätze wurden anschließend in chemo-kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

3.1.8 Transformation von DNA in chemokompetente *E. coli*

Zunächst wurden 50 µl chemokompetente *E. coli*-Bakterien mit 10 µl Ligationsansatz gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 50 s, gefolgt von einer weiteren Inkubation auf Eis für 5 min. Nach Zugabe von 500 µl vorgewärmtem LB-Medium, wurden die transformierten Bakterien für 1 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin folgte das Ausstreichen von 250 µl der Bakteriensuspension auf Ampicillin- oder Kanamycin-haltige LB-Agar-Platten, welche anschließend für 16 h bei 37°C inkubiert wurden.

3.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Transformierte *E. coli* Einzelklone wurden in 5 ml 100 µg/ml Ampicillin- oder 50 µg/ml Kanamycin-haltiges LB-Flüssigmedium überführt und für 16 h bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet erfolgte mit Hilfe des *peqGOLD® Plasmid Miniprep Kit I* (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Herstellerangaben. Die eluierte Plasmid-DNA wurde für analytische Zwecke genutzt.

Die Plasmid-Aufreinigung aus größeren Bakterienkulturen von 400 ml wurde nach Herstellerangaben mit dem *NucleoBond® Xtra Maxi Plasmid Purification Kit* (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt.

3.1.10 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte mit Hilfe des NanoDrop 1000 Spektrophotometers. Dazu wurden 2 µl der jeweiligen Nukleinsäurelösung auf das Gerät pipettiert und die Konzentration der Nukleinsäure bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

3.1.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe geeigneter Primer nach der Sanger-Methode sequenziert. Dazu wurden 0,5 µg der Plasmid-DNA mit 200 nM des einzusetzenden Primers in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt und dem Sequenzierservice der Firma GATC (Konstanz) zugesandt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit der Software SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC, Chicago, USA) analysiert.

3.2 Zellbiologische und immunologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die in 2.12 aufgeführten Zelllinien wurden in ihrem entsprechenden Medium kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden, in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsrate und Konfluenz, zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Adhärente Zellen wurden hierzu mit 1x DPBS gewaschen und mit 0,05%iger Trypsin/EDTA Lösung versetzt. Nach ausreichender enzymatischer und mechanischer Dissoziation der Zellen wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden durch Resuspendieren vereinzelt und je nach Zelllinie im Verhältnis von 1:5 bis 1:20 in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Wachstumsmedium überführt. Suspensionszellen wurden direkt resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in neuen Kulturflaschen weiterkultiviert.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Einweg-Zählkammer (Kova) bestimmt. Dazu wurden 15 µl der Zellsuspension mit 15 µl einer 0,4%-igen Trypanblau-Lösung gemischt und 15 µl der Mischung in die Zählkammer überführt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, welcher die Proteine abgestorbener Zellen blau anfärbt, wohingegen lebende Zellen mit intakter Zellmembran ungefärbt unter dem Lichtmikroskop zu erkennen sind. Diese wurden gezählt und die Zelldichte pro ml wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zelldichte} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 90 \text{ (Kammerfaktor)} \times 10^3$$

3.2.3 Kryokonservierung von Säugerzellen

Alle in dieser Arbeit generierten und genutzten Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff konserviert. Dazu wurden im Fall der NK-92 die Zellen resuspendiert, bei 1300 x g für 3 min zentrifugiert und 4 - 5 x 10⁶ Zellen in 2 ml humanem Plasma, versetzt mit 10% DMSO, in ein Kryoröhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden in eine vorgekühlte Einfrierhilfe überführt, welche anschließend bei -80°C gelagert wurde. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt. K562 Zellen wurden ähnlich eingefroren, allerdings in FBS versetzt mit 10% DMSO als Einfriermedium. Adhärente Zellen wurden trypsinisiert, bevor sie, ebenfalls in FBS und 10% DMSO, eingefroren wurden.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in Wachstumsmedium überführt und zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und die Zellen wurden bei 37°C kultiviert.

3.2.4 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Lymphozyten-Separations-Medium
(Ficoll®, Natriumdiatrizoat)

Lonza (Basel, Schweiz)

Unter mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) werden einkernige Zellen mit rundem Zellkern, wie Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen verstanden. Diese wurden aus *Buffy-Coats* von gesunden, menschlichen Spendern mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die *Buffy-Coats* wurden hierzu vom Blutspendedienst Frankfurt zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden 50 ml *Buffy-Coat* mit 90 ml 2 mM EDTA-haltigem DPBS verdünnt. Je 35 ml wurden auf 15 ml Ficoll®-Lösung (Lymphozyten-Separations-Medium) in einem 50 ml Schraubdeckelröhrchen überschichtet und bei 400 x g für 35 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch wurden die PBMCs von Erythrozyten und Granulozyten getrennt und konnten in ein neues Gefäß überführt werden. Die PBMCs wurden dreimal mit 2 mM EDTA-haltigem DPBS gewaschen und jeweils für 10 min nacheinander bei 300 x g, 250 x g und 200 x g abzentrifugiert. Aus den PBMCs wurden entweder Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen oder Makrophagen generiert.

3.2.5 Generierung von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen

Zunächst wurden 2×10^6 isolierte PBMCs/cm² in einer 10 cm Kulturschale in Wachstumsmedium (RPMI⁺⁺⁺) ausgesät und für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dieses Verfahren macht sich die Eigenschaft von Monozyten zu Nutze, an Plastik zu adhären. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurden nicht-adhärenente Zellen abgesaugt und die Monozyten dreimal mit warmem Wachstumsmedium gewaschen. Anschließend wurden die Monozyten mit 8 ml RPMI⁺⁺⁺ sowie GM-CSF (50 ng/ml) und IL-4 (50 ng/ml) versetzt und für 5 Tage bei 37°C zu unreifen dendritischen Zellen (Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen, *monocyte-derived dendritic cells*, MoDC) differenziert. Dabei wurde an Tag 3 das Medium mit den Suspensionszellen in ein 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und bei 180 x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Wachstumsmedium mit GM-CSF und IL-4 resuspendiert und die Zellen wurden wieder ausgesät. An Tag 5 wurden 5×10^5 unreife MoDC in 1 ml Wachstumsmedium mit GM-CSF und IL-4 in eine 24-well Kulturplatte ausgesät. An Tag 6 wurden die Zellen für weitere 24 h entweder durch die Zugabe eines Reifungscocktails, bestehend aus IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (25 ng/ml), Prostaglandin E2 (PGE2, 1 μ g/ml) und TNF- α (10 ng/ml), zu reifen MoDC differenziert oder in einem Transwell-Experiment eingesetzt.

3.2.6 Generierung von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen

Teflon-beschichteter Beutel
(PermaLife Cell Culture Bag)

OriGen Biomedical GmbH (Burladingen)

Nach der Isolierung der PBMCs wurden 1×10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen und mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper auf CD14 gefärbt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer LSRFortessa. Der Anteil CD14-positiver Zellen entspricht dem prozentualen Anteil an Monozyten in der isolierten Zellsuspension. Dadurch konnte ermittelt werden, wie viele PBMCs eingesetzt werden mussten, um eine Gesamtzellzahl an Monozyten von 5×10^7 zu erhalten. Die berechnete Anzahl an PBMCs wurde zentrifugiert, das Pellet in 30 ml RPMI-Medium (versetzt mit 5% humanem Plasma und 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und die Zellen wurden in einen Teflon-beschichteten Beutel ausgesät. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Dazu wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt, bei $400 \times g$ für 8 min zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellen zurück in den Beutel pipettiert. Die Differenzierung der Monozyten zu unpolarisierten Makrophagen (Monozyten-abgeleitete Makrophagen, *monocyte-derived macrophages*, MDM) umfasste sieben Tage. Anschließend wurden die MDM phänotypisch charakterisiert und polarisiert (M1-Makrophagen: IFN- γ (50 ng/ml) + LPS (10 ng/ml), M2-Makrophagen: IL-10 (20 ng/ml) oder zur Durchführung eines Transwell-Experiments (3.2.7) eingesetzt.

3.2.7 Transwell-Experimente mit Immunzellen

Zellkultureinsätze (ThinCert™ Cell Culture Inserts)

Greiner Bio-One (Österreich)

Um den Einfluss der von aktivierten NK-92 Zellen sekretierten Zytokine auf den Phänotyp von humanen Immunzellen untersuchen zu können, wurden Transwell-Experimente durchgeführt. Dazu wurden 4×10^5 - 5×10^5 primäre Immunzellen (MoDC oder MDM) in 1 ml Wachstumsmedium in eine 6-well Kulturplatte ausgesät. Es wurden Zellkultureinsätze verwendet, deren Boden aus einer für Zytokine durchlässigen Membran mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße bestand, um die Immunzellen von NK-Zellen und Tumorzellen zu separieren. In die Einsätze wurden NK-Zellen und/oder Tumorzellen in 1,5 ml Wachstumsmedium pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h oder 48 h wurden die Zellkultureinsätze entfernt, die MoDC oder MDM geerntet und mittels Durchflusszytometrie (3.2.11) auf die Expression diverser Oberflächenmarker hin analysiert.

3.2.8 Generierung lentiviraler Vektorpartikel in HEK293T Zellen

HEK293T Zellen wurden mit einem Drei-Plasmid-System transient transfiziert, um virale VSV-G (*vesicular stomatitis virus protein-G*)-pseudotypisierte Vektorpartikel zu produzieren. Dazu wurden 4×10^6 HEK293T Zellen in eine 10 cm Kulturschale ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Daraufhin wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 5 ml Serum-freiem Medium für 2 h inkubiert, bevor die Zugabe des Transfektionsansatzes erfolgte. Dieser wurde in 500 µl DPBS angesetzt und beinhaltete 10 µg Transferplasmid, 6,5 µg Verpackungsplasmid (pCMVΔR8.91) und 3 µg Hüllplasmid (pMD2.G), welche mit einer 10 mM PEI-Lösung (2,7 µl PEI pro 1 µg DNA) gemischt und für 15 min bei RT vorinkubiert wurden. Nachdem der Ansatz auf die Zellen getropft wurde, folgte eine Inkubationszeit von 4 h bei 37°C. Anschließend wurde das Serum-freie Medium abgesaugt und 7 ml frisches Wachstumsmedium (DMEM⁺⁺⁺) wurden zu den Zellen hinzugegeben. Nach 72 h wurde der Vektorpartikel-enthaltende Kulturüberstand abgenommen, steril filtriert (Porengröße 0,45 µm) und für die lentivirale Transduktion von Säugerzellen verwendet. Die transfizierten HEK293T Zellen wurden geerntet, mit 1% Formaldehyd fixiert und die Transfektionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie (3.2.11) überprüft.

3.2.9 Bestimmung des Vektortiters

Um den Titer (*transforming units per ml*, TU/ml) der von den transfizierten HEK293T Zellen produzierten lentiviralen Vektorpartikel zu bestimmen, wurden frische 1×10^5 HEK293T Zellen in Triplikaten in eine 24-well Kulturplatte in einem Volumen von 500 µl Wachstumsmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Vor der Transduktion wurden Vektorpartikel-Verdünnungen von 1:100 bis 1:10000 in einem Gesamtvolumen von 250 µl angesetzt. Daraufhin wurde das Medium der ausgesäten HEK293T Zellen entfernt und durch 250 µl frisches Wachstumsmedium und 250 µl einer der Vektorpartikel-Verdünnungen ersetzt. Die Transduktion erfolgte in Anwesenheit von 8 µg/ml Polybren. Die Ansätze wurden bei 1800 x g, 32°C für 60 min zentrifugiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch frisches Wachstumsmedium ersetzt. Drei Tage nach der Transduktion wurde der Anteil transduzierter Zellen über die GFP (*green fluorescent protein*)-Expression mittels Durchflusszytometrie (3.2.11) bestimmt. Der Titer wurde basierend auf Transduktionseffizienzen von ≤ 15% mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Titer [TU/ml]} = \text{Anzahl ausgesäter Zellen} \times \frac{\% \text{ positive Zellen}}{100} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.10 Lentivirale Transduktion von NK-92 Zellen

BX795 (Multi-Kinase-Inhibitor)

InvivoGen (Kalifornien, USA)

NK-92 Zellen wurden resuspendiert und ihre Zellzahl bestimmt. 5×10^5 Zellen wurden in 2 ml Vektorpartikel-enthaltendem Kulturüberstand aufgenommen und in eine 6-well Kulturplatte in Anwesenheit von 8 µg/ml Polybren und 6 µM des Multi-Kinase-Inhibitors BX795 ausgesät. BX795 inhibiert den TBK1/IKKe-Komplex, einen Mediator der Signalwege von RIG-I, MDA-5 und TLR3 (Sutlu et al., 2012). Dadurch kann die Erkennung lentiviraler RNA, sowie einer daraus resultierenden antiviralen Antwort unterbunden werden, was die Transduktionseffizienz steigert. Die Zellen wurden nach der *Spinfection* Methode für 60 min bei 1800 x g und 32°C zentrifugiert und anschließend für 6 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Vektorpartikel-enthaltende Kulturüberstand wurde nach Zentrifugation entfernt. Nachdem die Zellen einmal mit DPBS gewaschen wurden, wurde das Zellpellet in frischem X-VIVO⁺⁺ aufgenommen und die Zellen wurden in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 72 h erfolgte die Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie (3.2.11).

3.2.11 Durchflusszytometrische Analysen

FACS-Puffer

3% [v/v] FBS in 1x DPBS

Human BD Fc Block™

BD Biosciences (Heidelberg)

(Fc-Rezeptor Blockierlösung)

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden am FACSCalibur, FACSCanto II oder am LSRT Fortessa durchgeführt. Hierbei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom mittels hydrodynamischer Fokussierung aufgereiht und auf ihre morphologischen und physikalischen Eigenschaften hin analysiert. Das Licht des *forward scatters* (FCS) ist dabei u.a. proportional zur Zellgröße, wohingegen das Licht des *sideward scatters* (SSC) z.B. von der Granularität der Zelle abhängt. Für die Analyse der Daten wurden die Software-Programme FlowJo und FACSDiva verwendet.

Bestimmung der Transfektions- und Transduktionseffizienz

Die in dieser Arbeit eingesetzten lentiviralen Transferplasmide kodieren für verschiedene Varianten des Grün-fluoreszierenden Proteins GFP (EGFP, tGFP), welches als Markergen genutzt wurde, um die Transfektions- oder Transduktionseffizienz zu ermitteln. Dazu wurden 2×10^5 Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, anschließend mit 1% Formaldehyd fixiert,

in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und im FITC-Kanal am Durchflusszytometer auf den Anteil der GFP-positiven Zellen hin untersucht. Als Negativ-Kontrolle dienten unmodifizierte Zellen.

Detektion von Oberflächenantigenen

Oberflächenantigene von Säugerzellen wurden durch Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern detektiert. Dazu wurden $2,5 - 1 \times 10^6$ Zellen in ein 5 ml Plastikröhrchen überführt, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und nach Zentrifugation in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden mit Fc-Rezeptor Blockierlösung (BD Biosciences) und gegebenenfalls mit einem Lebend-Tot Marker (*LIVE/DEAD™ Fixable Blue Dead Cell Stain Kit*, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben versetzt. Es folgte die Zugabe von einem oder mehreren (Mehrfarben-Durchflusszytometrie) Primärantikörpern und eine anschließende Inkubationszeit für 30 min - 1 h bei 4°C. Die Zellen wurden erneut mit FACS-Puffer gewaschen. Im Fall eines Fluorochrom-gekoppelten Primärantikörpers erfolgte direkt anschließend die Analyse am Durchflusszytometer. War der Primärantikörper nicht direkt gekoppelt, wurden die Zellen zunächst noch mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper für 15 min auf Eis inkubiert. Danach schloss sich ein weiterer Waschschrift an, bevor auch hier die Analyse an einem der Durchflusszytometer erfolgte. Als Negativ-Kontrollen dienten ungefärbte Zellen und Zellen, die entweder nur mit dem Zweitantikörper oder einem mit dem gleichen Fluorochrom-gekoppelten irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps, versetzt wurden.

3.2.12 Fluoreszenz-basierte Zellsortierung

Neben den durchflusszytometrischen Analysen können transduzierte Zellen basierend auf einer Fluoreszenz über FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) angereichert werden.

Anreicherung eines transduzierten Zellpools

Das Resultat einer Transduktion von Säugerzellen ist eine heterogene Zellpopulation bestehend aus untransduzierten und transduzierten Zellen. Die Transduktionseffizienz ist dabei von Zelltyp zu Zelltyp sehr verschieden. So weisen NK-92 Zellen eine geringe Transduktionseffizienz auf. Um einen möglichst homogenen Zellpool bestehend aus transduzierten Zellen zu gewinnen, wurden diese Zellen mittels Fluoreszenz-basierter Zellsortierung angereichert. Dazu wurden die Zellen nach der Transduktion für mehrere Tage expandiert, anschließend pelletiert und zweimal mit DPBS gewaschen. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 1 - 2 ml FACS-Puffer aufgenommen und durch ein Zellsieb mit 0,4 µm Porengröße vereinzelt. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt. Transduzierte Zellen

wurden anhand ihrer GFP-Expression an einem FACSAria Zellsortiersystem heraussortiert. Daraufhin wurden die sortierten Zellen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Wachstumsmedium aufgenommen und die Zellen wurden bei 37°C expandiert.

Einzelzellsortierung

Neben der Anreicherung eines transduzierten Zellpools ist auch die Gewinnung von NK-92 Einzelzellklonen mit Hilfe des FACSAria Zellsortiersystems möglich. Dazu wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, vorbereitet. Einzelzellen wurden anhand ihrer EGFP- oder tGFP-Expression in eine individuelle Vertiefung einer 96-well Kulturplatte sortiert. In jede Vertiefung wurden zuvor 200 µl Wachstumsmedium vorgelegt. Die Einzelzellklone wurden für zwei bis drei Wochen expandiert und auf ihre Funktionalität hin untersucht.

3.2.13 Zytotoxizitätsassay

Calcein Violet AM (CV)-Stammlösung	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
	25 µg wurden in 42 µl DMSO resuspendiert
Propidiumiodid (PI)-Lösung	1 µg/ml in 1x DPBS

Um zu ermitteln, ob die Inhibierung der IL-10 Produktion, Sekretion oder Aktivität einen Einfluss auf die natürliche oder CAR-vermittelte zytotoxische Aktivität von NK-92 Zellen (Effektorzellen) gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien (Zielzellen) hat, wurde ein FACS-basierter Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Zunächst wurden 4×10^6 Zielzellen in 1 ml RPMI-Medium (ohne Zusätze) aufgenommen, mit 1,5 µl Calcein Violet versetzt und bei 4°C für 20 min inkubiert. Die Färbung der Zielzellen mit CV dient der Unterscheidung von den Effektorzellen. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit RPMI-Medium (ohne Zusätze) gewaschen und auf eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml in X-VIVO⁺⁺ Medium eingestellt. Parallel hierzu wurden die Effektorzellen resuspendiert, gezählt und ihre Zellzahl auf 2×10^6 Zellen/ml in X-VIVO⁺⁺ Medium eingestellt. Die Effektorzellen wurden mit den gefärbten Zielzellen in unterschiedlichen Effektor- zu *Target*-Zell (E/T) Verhältnissen von 10:1, 5:1 und 1:1 in einer 96-well Kulturplatte für 2 h bei 37°C ko-inkubiert. Weiterhin wurden Zielzellen ohne Effektorzellen mitgeführt, welche als Kontrolle für die spontane Lyse dieser Zellen dienten. Nach der Inkubation folgte das Pelletieren der Zellen bei 1300 x g für 3 min und das Verwerfen des Überstandes. Unmittelbar vor der Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellpellets in 190 µl PI-Lösung resuspendiert, um tote Zellen spezifisch zu markieren. Die Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und am FACSCanto II gemessen. Tote Zielzellen waren CV und PI doppelt positiv. Von dem gemessenen prozentualen Lysewert

wurde der Anteil an spontan lysierten Zielzellen subtrahiert, um den spezifisch NK-Zell-vermittelten Lysewert der eingesetzten Tumorzellen zu ermitteln.

3.2.14 Proliferationsassay

Die Lebensfähigkeit und das Wachstum von parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen analysiert. Dazu wurden $1,5 \times 10^5$ NK-92 Zellen in 1 ml X-VIVO⁺⁺ Medium in eine 24-well Kulturplatte an Tag 0 ausgesät und die Zellzahl einzelner Vertiefungen über eine Trypanblau-Färbung täglich bestimmt.

3.2.15 Stimulierung von NK-92 Zellen

Um die Expression und Sekretion von IL-10 und weiteren Zytokinen in NK-92 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen entweder mit Tumorzellen oder PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) und Ionomycin stimuliert. Um die neutralisierende Aktivität des anti-IL-10 Mini-Antikörpers zu bestimmen, wurden NK-92 Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit des Antikörpers mit rekombinanten IL-10 behandelt und anschließend auf die Phospho-STAT3 (pSTAT3) Expression hin analysiert. Die Behandlung mit Thapsigargin diente der Induzierung von ER-Stress, was als Positiv-Kontrolle bei der Untersuchung einer möglichen ER-Funktionsstörung in Intrabody-exprimierenden NK-92 Zellen mitgeführt wurde.

Stimulierung mit Tumorzellen

5×10^5 NK-92 Zellen wurden mit Tumorzellen in einem Verhältnis von 1:1 in 1 ml frischem X-VIVO⁺⁺ gemischt, in einer 24-well Kulturplatte ausgesät und für 6 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen wurden Medium, sowie voneinander getrennt ausgesäte NK-92 und Tumorzellen mitgeführt. Anschließend wurden die Proben in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 1300 x g für 3 min zentrifugiert und 100 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Zellkulturüberstände wurden bei -80°C gelagert, bevor sie mittels *Cytometric Bead Array* auf den Gehalt an Zytokinen analysiert wurden (3.2.17).

Stimulierung mit PMA und Ionomycin

GolgiPlug	BD Biosciences (Heidelberg)
Ionomycin-Stammlösung	1 mg/ml in DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)-Stammlösung	1 mg/ml in DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

$2,5 \times 10^6$ NK-92 Zellen wurden in 2,5 ml X-VIVO⁺⁺ in eine 6-well Kulturplatte ausgesät und mit je 2,5 µl PMA- und Ionomycin-Stammlösung (Endkonzentration je 1 µg/ml) versetzt und bei 37°C inkubiert. PMA und Ionomycin aktivieren die Protein-Kinase C, was eine verstärkte Expression von Genen, die u.a. für Zytokine kodieren, zur Folge hat. Nach einer Inkubationszeit von 1 h oder 5 h wurden die Zellen geerntet, Gesamt-RNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben (3.1.1). Anschließend erfolgte die Analyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR (3.1.3).

Zur Analyse der IL-10 Expression auf Protein-Ebene wurden zu den Zellen nach einstündiger Inkubation mit PMA- und Ionomycin 2,5 µl GolgiPlug pipettiert und für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. GolgiPlug enthält Brefeldin A, welches den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat blockiert und somit zu der Akkumulation von Zytokinen innerhalb der Zellen führt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und zweimal mit DPBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und aus dem Pellet wurden Zelllysate hergestellt (3.3.2). Die Proteinexpression wurde mittels SDS-PAGE (3.3.4) und Immunoblot-Analyse (3.3.5) untersucht.

Stimulierung mit IL-10

2×10^6 parentale NK-92 Zellen wurden in 2 ml frischem X-VIVO Medium mit 5% humanem Plasma (X-VIVO⁺) in eine 6-well Kulturplatte ausgesät und über Nacht inkubiert. Da bereits bekannt ist, dass IL-2 die Phosphorylierung von STAT3 initiieren kann (Frank et al., 1995), wurde in diesem Experiment auf IL-2 im X-VIVO Medium verzichtet. Um die neutralisierende Aktivität des anti-IL-10 Mini-Antikörpers zu bestimmen, wurden am Folgetag in parallel durchgeführten Ansätzen unterschiedliche Konzentrationen (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml) des Mini-Antikörpers mit 40 ng/ml IL-10 in 1 ml X-VIVO⁺ für 25 min bei RT vorinkubiert. Die IL-2 ausgehungerten NK-92 Zellen wurden pelletiert, in 1 ml X-VIVO⁺ und 1 ml eines der vorinkubierten Ansätze (anti-IL-10 Mini-Antikörper + IL-10) resuspendiert, in eine 6-well Kulturplatte ausgesät und für 20 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. NK-Zellen, die nur mit rekombinantem IL-10 inkubiert wurden oder unbehandelt blieben, dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen je in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, zweimal mit DPBS gewaschen und mit RIPA Puffer (versetzt mit *Complete* Protease-Inhibitor Cocktail und *PhosSTOP* Phosphatase-Inhibitor Cocktail) resuspendiert, um Zelllysate herzustellen (3.3.2). Das Gesamt-Proteinlysate wurde mittels SDS-PAGE (3.3.4) und Immunoblot-Analyse (3.3.5) auf die Phosphorylierung von STAT3 hin untersucht.

Stimulierung mit Thapsigargin

Thapsigargin-Stammlösung 1,2 mM gelöst in DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Um in NK-92 Zellen eine ER-Funktionsstörung und damit einen *unfolded protein response* (UPR) auszulösen, wurden die Zellen mit Thapsigargin stimuliert. Dazu wurden 2×10^6 NK-92 Zellen in 3 ml X-VIVO⁺⁺ Medium in eine 6-well Kulturplatte ausgesät und mit 0,5 μ M Thapsigargin (gelöst in DMSO) für 12 h - 14 h im Brutschrank inkubiert. Mit der gleichen Menge an DMSO versetzte Zellen dienten als Kontrolle für die spezifische Wirkung des Thapsigargin. Anschließend wurden die Zellen geerntet, zweimal mit DPBS gewaschen und mit RIPA Puffer (versetzt mit *Complete* Protease-Inhibitor Cocktail) resuspendiert, um Zelllysate herzustellen (3.3.2). Weiterhin wurde mittels SDS-PAGE (3.3.4) und Immunoblot-Analyse (3.3.5) die Expression ER-spezifischer Stressproteine in den Gesamt-Zelllysaten untersucht.

3.2.16 Stimulierung von B16-F10/ErbB2 Zellen mit IFN- γ

2×10^5 B16-F10/ErbB2 Zellen wurden in 2 ml frischem DMEM⁺⁺⁺ in eine 6-well Kulturplatte ausgesät und für 48 h entweder mit 20 ng/ml murinem IFN- γ oder 20 ng/ml humanem IFN- γ im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, in ein FACS-Röhrchen überführt und mittels Durchflusszytometrie (3.2.11) auf ihre MHC-Klasse I Expression hin analysiert.

3.2.17 Analyse der Zytokin-Sekretion

Die Zytokin-Sekretion von mit Tumorzellen stimulierten NK-92 Zellen wurde mit Hilfe eines *Cytometric Bead Array* (CBA) nach Herstellerangaben ermittelt. Zum Einsatz kam das für jedes Zytokin entsprechende CBA *Human Flex Set* (BD Biosciences) und das CBA *Human Soluble Protein Master Buffer* Kit. Die Überstände der aktivierten Zellen wurden auf die Zytokine IFN- γ , IL-10, TNF- α und das Chemokin MIP-1 α hin analysiert. Die Daten wurden mit Hilfe der BD FCAP ArrayTM Software (BD Biosciences) ausgewertet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 ELISA

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung	KPL (Deutschland)
96-well Mikroplatte, MICRO-LON®600	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Blockierlösung	5% [w/v] BSA in 1x DPBS
Waschpuffer	0,05% [v/v] TWEEN® 20 in 1x DPBS

Mit Hilfe des ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist es möglich, die Bindung eines Antikörpers an ein immobilisiertes Zielprotein nachzuweisen. In diesem Fall diente der ELISA zur Bestimmung der Antigenspezifität des anti-IL-10 Mini-Antikörpers. Dazu wurde eine 96-well Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) mit 5 µg/ml humanem IL-10 in 100 µl 1x DPBS pro Vertiefung über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurde die Platte zweimal mit 200 µl Waschpuffer je Vertiefung gewaschen, bevor unspezifische Bindungsstellen mit 100 µl Blockierlösung für 1 h bei RT abgesättigt wurden. Nach zweimaligem Waschen der Platte wurden unterschiedliche Konzentrationen des anti-IL-10 Mini-Antikörpers in 100 µl Blockierlösung in Triplikaten auf die Platte aufgetragen und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten anti-human-IgG Detektionsantikörper (1:10000) in 100 µl 1% BSA-DPBS-Lösung für 1 h bei 37°C. Anschließend wurde zweimal gewaschen und 100 µl TMB-Substratlösung wurden in jede Vertiefung pipettiert, welches bis zum blauen Farbumschlag bei RT inkubiert wurde. Die Farbreaktion ist ein Indikator für die Aktivität der HRP, welche das TMB-Substrat oxidiert. Durch die Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure wurde die Reaktion abgestoppt, was in einem gelben Farbumschlag resultierte. Schließlich wurden die Signale an einem Spektrophotometer (Anthos Reader 2001) bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm gemessen. Zusätzlich wurde eine Referenzmessung bei 650 nm durchgeführt, deren Wert von dem Wert der Messwellenlänge bei $\lambda=450$ nm subtrahiert wurde. Dadurch ist es möglich Fehler zu reduzieren, die beispielsweise durch unspezifische Hintergrundsignale der Mikrotiterplatte verursacht werden. Die Daten wurden mit Hilfe der Prism Software (GraphPad, La Jolla, USA) ausgewertet. Neben den beschriebenen Ansätzen wurden entsprechende Kontrollen mitgeführt. So wurden mit IL-10 beschichtete Vertiefungen nur mit dem Detektionsantikörper inkubiert, um eine unspezifische Bindung an das Zielprotein auszuschließen. Vertiefungen, die mit IL-2 anstelle von IL-10 beschichtet wurden, dienten als Kontrolle zur Überprüfung der Antigenspezifität des anti-IL-10 Mini-Antikörpers. Weiterhin wurden nicht beschichtete aber mit Blockierlösung versetzte Vertiefungen mitgeführt, um die Effizienz der Blockierlösung zu ermitteln und ein unspezifisches Binden des Mini-Antikörpers auszuschließen.

3.3.2 Herstellung von Zelllysaten

RIPA (<i>radioimmunoprecipitation assay</i>)-Puffer	50 mM Tris HCl pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1% [w/v] SDS 0,5% [w/v] Natrium-Desoxycholat 1% [v/v] NP-40
7 x <i>Complete</i> Protease-Inhibitor Cocktail	1 Tablette gelöst in 1,5 ml ddH ₂ O (Roche Diagnostics)
10 x <i>PhosSTOP</i> Phosphatase-Inhibitor Cocktail	1 Tablette gelöst in 1 ml ddH ₂ O (Roche Diagnostics)

NK-92 Zellen wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert, bei 1300 x g für 3 min zentrifugiert und mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert und nochmals mit DPBS gewaschen, um Medium-Reste vollständig zu entfernen. Nach einem weiteren Zentrifugierschritt wurde der Überstand entfernt, das Pellet je nach Menge in 80 - 150 µl RIPA-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Dem RIPA-Puffer wurde vor Gebrauch 1/7 [v/v] *Complete* Protease-Inhibitor Cocktail und bei Analyse von Phosphorylierungen 1/10 [v/v] *PhosSTOP* Phosphatase-Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Anschließend erfolgte ein Sonifizierschritt dreimal auf mittlerer Stufe für jeweils 10 s (Bioruptor, Diagenode). Die verbliebenen Zelltrümmer wurden für 10 min bei 14000 rpm und 4°C sedimentiert. Das überstehende Proteinlysate wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde nach Bradford spektrophotometrisch bestimmt.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
------------------	------------------------------------

Bei der Quantifizierung der Proteinmenge nach Bradford kommt der Farbstoff Coomassie-Brillantblau zum Einsatz. Dieses Reagenz bindet in saurer Lösung, über die Wechselwirkungen mit kationischen und nicht-polaren, hydrophoben Seitenketten, an Proteine. Dadurch entstehen blaue Komplexe, welche ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 595 nm besitzen. Dabei ist die Zunahme der Absorption direkt proportional zur Proteinkonzentration in der gemessenen Lösung. Zunächst wurde das Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:5 in ddH₂O verdünnt und je 1 ml in einer Küvette vorgelegt. 2 µl des Proteinextraktes oder 2 µl Zellysepuffer als Referenz wurden hinzu pipettiert. Die Ansätze

wurden gemischt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert, bevor die Absorption am Evolution 60 Photometer bei 595 nm gemessen wurde.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	30% [w/v] Acrylamid, 0,8% [w/v] Bisacrylamid,
Ammoniumpersulfat (APS) -Lösung	10% [w/v] APS in ddH ₂ O, Carl Roth (Karlsruhe)
Sammelgelpuffer	1 M Tris HCl, pH 6,8
SDS-Laufpuffer	24 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% [w/v] SDS, pH 8,3
SDS-Lösung	10% [w/v] SDS (Carl Roth) in ddH ₂ O
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris HCl, pH 8,8
5 x Proteinprobenpuffer	50 mM Tris HCl (pH 6,8), 10% [v/v] Glycerol, 2% [w/v] SDS, 0,1% [w/v] Bromphenolblau, 3% [v/v] β -Mercaptoethanol

Das Proteinlysats wurde mit 1/5 [v/v] Proteinprobenpuffer versetzt und die Proben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) untersucht. Dazu wurde ein Trenngel und ein Sammelgel hergestellt, welche aus den in Tab. 16 aufgeführten Komponenten zusammengesetzt waren. Das im Proteinprobenpuffer und in den Gelen enthaltene SDS sorgt für eine negative Nettoladung der Proteine, was die nachfolgende Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht. Neben den Proteinproben wurden 6 μ l des Protein-Markers IV (PeqLab) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V und einem konstanten Stromfluss von 15 mA in 1x SDS-Laufpuffer.

Tab. 16: Zusammensetzung der Polyacrylamid (PAA)-Gele mit den Maßen 7 x 9 cm.

Komponente	Trenngel				Sammelgel
	7,5%	10%	12,5%	15%	
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	2 ml	2,66 ml	3,32 ml	4 ml	670 μ l
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	-	-	500 μ l
ddH ₂ O	4 ml	3,32 ml	2,66	2 ml	2,7 ml
10% SDS-Lösung	80 μ l	80 μ l	80 μ l	80 μ l	40 μ l
10% APS-Lösung	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	40 μ l
TEMED					4 μ l

3.3.5 Immunoblot

Anode I-Puffer	300 mM Tris-HCl, 20% [v/v] Ethanol, pH 10,4
Anode II-Puffer	25 mM Tris-HCl, 20% [v/v] Ethanol, pH 10,4
Blockierlösung	5% [w/v] Magermilchpulver oder 5% [w/v] BSA in TBST
Kathode III-Puffer	25 mM Tris-HCl, 40 mM 6-Amino-n-hexansäure, 20% [v/v] Ethanol, pH 10,4

Mit Hilfe der Immunoblot-Methode wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran mittels *Semi-dry*-Verfahren übertragen und über spezifische Antikörper nachgewiesen.

Dazu wurde die PVDF-Membran in Ethanol aktiviert, mit ddH₂O gewaschen und anschließend in Anoden II-Puffer inkubiert. Der Aufbau des Blots umfasste zwei Lagen Whatman Filterpapier getränkt in Anode I-Puffer, zwei Lagen Whatman Filterpapier getränkt in Anode II-Puffer, die PVDF-Membran gefolgt von dem SDS-Polyacrylamidgel und zwei Lagen Whatman Filterpapier getränkt in Kathode III-Puffer. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 50 mA pro Gel in der Blotting-Apparatur (Fröbel Labortechnik). Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die PVDF-Membran nach Beendigung des Transfers für 1 h bei RT mit Blockierlösung auf dem Rollmischer inkubiert. Ob dabei 5% Magermilchpulver oder 5% BSA gelöst in TBST zum Einsatz kam, hing von den Anforderungen des eingesetzten Primärantikörpers ab. Im nächsten Schritt wurde die Blockierlösung entfernt und die Membran mit einem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem passenden HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit TBST und die Detektion der Proteinbanden mit Hilfe einer ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Lösung (*Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* oder *Super Signal West Dura Trial Kit*, Thermo Fisher Scientific), die nach Herstellerangaben angesetzt wurde. Die Chemilumineszenz wurde unter Lichtabschluss durch Auflegen und Entwicklung eines Röntgenfilms (Fuji Film) erfasst.

3.4 Experimente mit Mäusen

3.4.1 Haltung von immunkompetenten Mäusen

Bei den verwendeten Albino Mäusen mit dem Genotyp B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrl handelt es sich um C57BL/6N Mäuse, die eine Mutation im Tyrosinase-Gen tragen. Dies führt zu einer kompletten Abwesenheit von Pigmenten in den Haaren, der Haut und in den Augen. Da das Immunsystem der Mäuse nicht beeinträchtigt ist, erforderte dies keine Besonderheiten in der Haltung der Tiere. Die Mäuse wurden in der Tierversuchseinrichtung des Georg-Speyer-Hauses gehalten. Die Haltung erfolgte in einem 12 h Hell/Dunkel-Zyklus bei 22°C und 55% relativer Luftfeuchte. Tierexperimente wurden nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Darmstadt gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.4.2 Induktion und Behandlung syngener B16-F10/ErbB2 Tumoren

Sechs Wochen alten, weiblichen Mäusen wurden 5×10^4 B16-F10/ErbB2 Tumorzellen (resuspendiert in 100 µl 1x DPBS) subkutan in die rechte Flanke verabreicht. Sieben Tage nach Tumorinokulation wurden die Mäuse durch peritumorale Injektion von 1×10^7 parentalen NK-92 Zellen, ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z oder IL-10-depletierten NK-92/5.28.z Zellen (jeweils resuspendiert in 200 µl 1x DPBS) behandelt. Tumor tragende Mäuse, denen 200 µl 1x DPBS injiziert wurde, dienten als Kontrolle. Die Behandlung wurde zweimal wöchentlich für insgesamt drei Wochen durchgeführt. Während des Versuchs wurden die Tiere regelmäßig gewogen, der Allgemeinzustand beurteilt und die Tumorgroße mit Hilfe einer Schieblehre ermittelt. Tiere, deren Tumor einen Durchmesser von annähernd 1,5 cm erreichte, wurden vorzeitig unter Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet, um ein unnötiges Leiden zu vermeiden.

3.5 Statistische Analysen

Für statische Analysen wurde der ungepaarte Student t-Test genutzt. Hierbei wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant erachtet. Um Unterschiede zwischen Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Mäusen zu beurteilen, wurde der Log-Rank-Test eingesetzt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit der Prism Software (GraphPad, La Jolla, USA) durchgeführt. Die in dieser Arbeit berechneten Signifikanzen wurden wie folgt gekennzeichnet:

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil des angeborenen Immunsystems und mitentscheidend für die Eliminierung maligner Zellen. Daher wird der adoptive Transfer von allogenen NK-Zellen vermehrt als Ansatz in der Immuntherapie diverser Tumorentitäten untersucht. Hierbei wird auch die klinisch einsetzbare NK-Zelllinie NK-92 genutzt, welche *in vitro* unter GMP-Bedingungen gut expandiert und genetisch modifiziert werden kann. Durch die Expression von chimären Antigenrezeptoren (CARs) nach retro- oder lentiviralem Gentransfer können NK-92 Zellen Tumorzellen selektiv erkennen und abtöten. Die in dieser Arbeitsgruppe generierte CAR NK-92 Zelllinie NK-92/5.28.z ist gegen das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 gerichtet und wird gegenwärtig klinisch erprobt. Der in dieser Zelllinie exprimierte CAR umfasst die variablen Domänen des ErbB2-spezifischen monoklonalen Antikörpers FRP5, eine CD8 α Gelenkregion, die Transmembran- und kostimulatorische Domäne von CD28 und eine CD3 ζ Signaldomäne (5.28.z). In einem syngenem Mausmodell wurde gezeigt, dass die Behandlung von Tumoren mit diesen ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen in der Mehrzahl der Tiere zur Tumorabstoßung führte und einen immunologischen Langzeitschutz gegen das Anwachsen erneut injizierter Tumorzellen induzierte (Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2017). Eine mögliche Erklärung für diese Modulation der endogenen Anti-Tumor-Immunantwort ist die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch aktivierte NK-Zellen, die die Aktivität von Immunzellen im Tumormikromilieu beeinflussen. In der Tat wurde *in vitro* nachgewiesen, dass aktivierte CAR NK-92 Zellen nach Kontakt mit Antigen-positiven Tumorzellen große Mengen pro-inflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ und GM-CSF in den Kulturüberstand sekretieren (Genssler et al., 2016; Nowakowska et al., 2018; Oelsner et al., 2017; Schonfeld et al., 2015). Interessanterweise produzieren aktivierte CAR NK-92 Zellen auch das immunregulatorische Zytokin IL-10 in hohen Mengen, das grundsätzlich pro-inflammatorischen Faktoren entgegenwirken und die endogene Anti-Tumor-Antwort dämpfen kann (Mittal and Roche, 2015). Allerdings wurde für IL-10 auch beschrieben, dass es die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen steigert (Emmerich et al., 2012; Mocellin et al., 2003). Somit ist bisher noch unklar, welche Einflüsse das von NK-Zellen sekretierte IL-10 im Tumormikromilieu genau hat.

Entsprechend war das Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung des von NK-Zellen sekretierten IL-10 für das Wachstum und die Funktion der NK-Zellen und seine Rolle in deren Interaktion mit anderen Immunzellen besser zu verstehen. Im Fokus der Untersuchungen stand hierbei die humane NK-Zelllinie NK-92 und die von diesen Zellen abgeleitete CAR Effektorzelllinie NK-92/5.28.z als klinisch relevante Modelle für die adoptive Immuntherapie. Um die Aktivität von IL-10 gezielt zu neutralisieren, wurde ein tetravalenter anti-IL-10 Mini-Antikörper mit vier IL-10 Bindestellen generiert und eingesetzt. Zudem wurden Ansätze untersucht, die IL-10 in NK-92 mittels shRNA-basiertem *knockdown*, CRISPR/Cas9-vermitteltem Gen-*knockout*, oder

intrazellulärer Expression antagonistischer scFv-Antikörper depletierten. Die mit der Reduktion der Produktion oder Aktivität von IL-10 verbundenen Effekte auf das Wachstum, die Zytotoxizität und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine von parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen wurden ebenso analysiert wie die Auswirkung auf die Reifung und Polarisierung ko-kultivierter, *in vitro* generierter dendritischer Zellen und Makrophagen. Bei den genannten Zelltypen handelt es sich um Antigen-präsentierende Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Tumor-spezifischen adaptiven Immunantwort spielen. Schließlich wurde in einem immunkompetenten Mausmodell untersucht, ob die Hemmung der IL-10 Sekretion einen Einfluss auf die *in vivo* Anti-Tumor-Aktivität von NK-92/5.28.z Zellen hat.

4.1 Expression von IL-10 und IL-10R α in NK-92 Zellen

4.1.1 Expression von IL-10

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Grundlage der Untersuchungen von Schönfeld et al. (Schönfeld et al., 2015) in unabhängig durchgeführten Experimenten zunächst die von der Aktivierung abhängige Expression von IL-10 in ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z und parentalen NK-92 Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene bestätigt (Abb. 4.1). Dabei wurde zunächst die Zytokinsekretion der NK-92 Zellen nach Zielzellkontakt untersucht. Parentale oder ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen wurden mit der gleichen Anzahl von K562 oder MDA-MB453 Tumorzellen inkubiert (Abb. 4.1 A). Als Kontrolle für die Bestimmung der IL-10 Sekretion im nicht aktivierten Zustand wurden NK-92 Zellen in Abwesenheit der Zielzellen kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und mit Hilfe eines *Cytometric Bead Array* auf das Vorhandensein von IL-10 hin analysiert. Es wurde festgestellt, dass parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen nach sechsstündiger Inkubation mit den Zielzellen große Mengen an IL-10 ausschütteten. Ruhende parentale NK-92 Zellen sekretierten nur wenig IL-10 (bis zu 0,12 ng/ml). Im Gegensatz dazu wurde IL-10 von nicht aktivierten NK-92/5.28.z Zellen bereits in einer Konzentration von 0,72 ng/ml in den Überstand abgegeben. Wurden parentale NK-92 Zellen mit K562 Zellen ko-inkubiert, so erhöhte sich die IL-10 Konzentration im Überstand auf bis zu 1,68 ng/ml. Nach Ko-Inkubation von NK-92/5.28.z Zellen mit ErbB2-positiven MDA-MB453 Zielzellen wurde ein Anstieg der IL-10 Sekretion auf bis zu 15,4 ng/ml beobachtet. Neben der Bestimmung der Sekretion von IL-10 nach Aktivierung der NK-Zellen durch Zielzellkontakt wurde die IL-10 Expression auch auf mRNA-Ebene über quantitative Echtzeit-PCR nach einer unspezifischen Aktivierung der Zellen für 1 h mit PMA und Ionomycin ermittelt (Abb. 4.1 B). Es ist bekannt, dass PMA und Ionomycin die Protein-Kinase C aktivieren, was zu einer verstärkten Expression nachgeschalteter Gene, die u.a. für Zytokine kodieren, führt (Chatila et al., 1989). So wurde ein Anstieg der IL-10 mRNA-Expression nach Stimulierung in parentalen und genmodifizierten NK-92 Zellen beobachtet. In NK-92/5.28.z Zellen steigerte sich die IL-10 mRNA um das 17,5-fache nach Behandlung mit

PMA und Ionomycin, wohingegen in parentalen NK-92 Zellen ein 12,1-facher Anstieg der IL-10 mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen induziert wurde. Die stärkere Expression von IL-10 in ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z Zellen gegenüber parentalen NK-92 Zellen nach unspezifischer Stimulierung konnte auch auf Protein-Ebene über Immunoblot-Analyse mit Hilfe eines IL-10-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 4.1 C). Hierzu wurden die NK-92 Zellen mit PMA und Ionomycin stimuliert und die Sekretion von IL-10 in das Medium wurde durch die Zugabe von GolgiPlug, einem Inhibitor des intrazellulären Proteintransports, unterbunden. Unter Einbeziehung der Ladekontrolle γ -Tubulin wurde in den Lysaten von aktivierten NK-92/5.28.z Zellen im Vergleich zu parentalen NK-92 Zellen ein stärkeres IL-10 Signal beobachtet. In den Lysaten beider Zelllinien wurde im Gegensatz zum CBA kein IL-10 Protein im nicht aktivierten Zustand der Zellen detektiert, was sehr wahrscheinlich an einer im Vergleich zum CBA niedrigeren Sensitivität des Immunoblot-Verfahrens liegt.

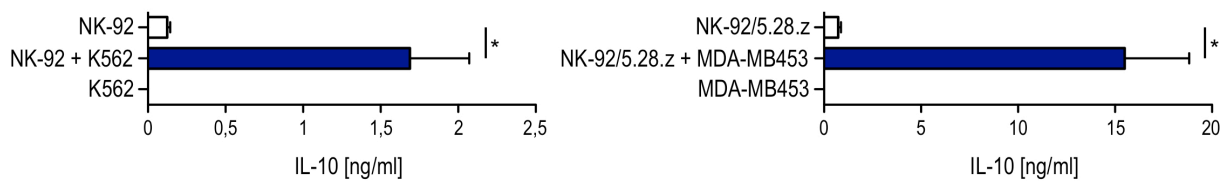
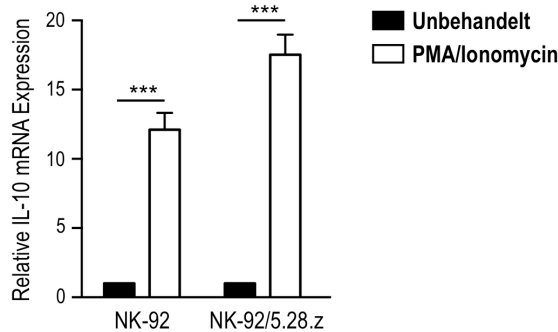
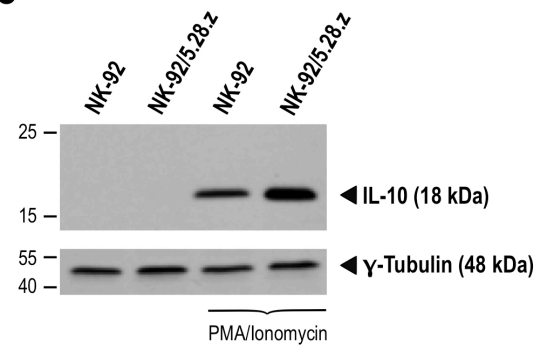
A**B****C**

Abb. 4.1: Nachweis der IL-10 Expression in parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen. (A) Analyse der IL-10 Sekretion nach Zielzellkontakt. 5×10^5 parentale oder ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit K562 oder MDA-MB453 Tumorzellen in 1 ml X-VIVO⁺⁺ für 6 h bei 37°C ko-inkubiert. NK-92 Zellen in Abwesenheit der Zielzellen, sowie Zielzellen allein dienten als Kontrollen. Die Zellkulturüberstände wurden mit Hilfe eines *Cytometric Bead Array* auf das Vorhandensein von IL-10 hin analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten nach Abzug der Hintergrund-Werte für das zellfreie X-VIVO⁺⁺ Medium. **(B) IL-10 mRNA-Expression nach Stimulierung mit PMA und Ionomycin.** $2,5 \times 10^6$ NK-Zellen wurden in 2,5 ml X-VIVO⁺⁺ ausgesät und mit PMA und Ionomycin (Endkonzentration je 1 μ g/ml) für 1 h stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf die IL-10 Expression hin analysiert. Für die relative Quantifizierung wurde die IL-10 Expression auf das konstant exprimierte Referenzgen β 2-Mikroglobulin normalisiert. Die relative IL-10 mRNA-Expression nicht aktivierter NK-92 Zellen wurde als 1 gesetzt und die Werte der mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen wurden relativ dazu berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. **(C) IL-10 Protein-Expression nach Stimulierung mit PMA und Ionomycin.** $2,5 \times 10^6$ NK-Zellen wurden in 2,5 ml X-VIVO⁺⁺ ausgesät und mit PMA und Ionomycin (Endkonzentration je 1 μ g/ml) in Anwesenheit von GolgiPlug für 5 Stunden stimuliert. Unstimulierte, aber mit GolgiPlug behandelte NK-Zellen dienten als Kontrolle. Je 20 μ g Gesamt-Zellysate wurden in einem 15%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion des Zytokins erfolgte mit einem IL-10-spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle wurde γ -Tubulin nachgewiesen. Zum Vergleich ist die Position ausgewählter Proteinstandards mit der jeweiligen molekularen Masse in kDa eingezeichnet. ***: $p < 0,001$, *: $p < 0,05$.

4.1.2 Expression von IL-10R α

Neben IL-10 wurde auch die Aktivierungs-unabhängige, konstitutive Expression des Rezeptors IL-10R α auf NK-92 Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 4.2). Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) dienten hierbei als Positiv-Kontrolle, da bekannt ist, dass der Rezeptor auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Moore et al., 2001). Es zeigte sich, dass parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen ein moderates Niveau an IL-10R α auf ihrer Zelloberfläche exprimierten (Abb. 4.2, grüne Linie). Hierbei wurden keine Unterschiede in der Stärke der IL-10R α -Expression zwischen parentalen NK-92 Zellen und ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z Zellen festgestellt.

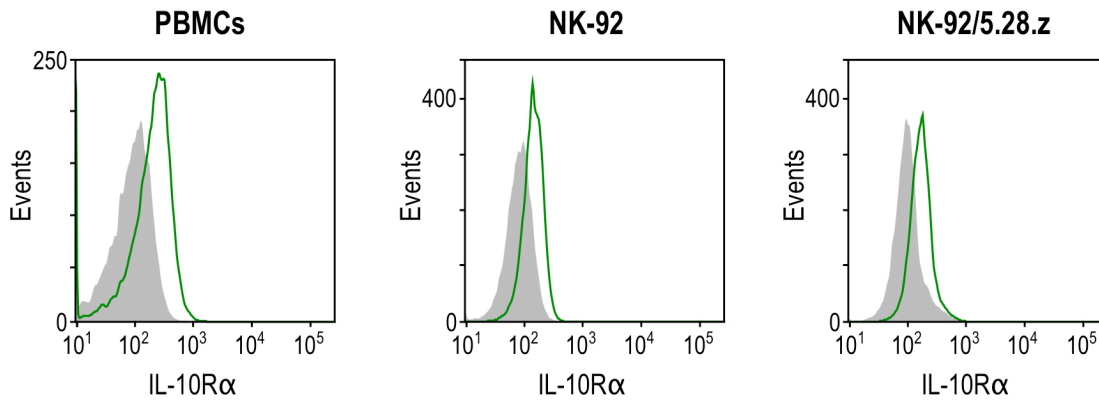


Abb. 4.2: IL-10R α -Expression auf parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen. Die IL-10R α -Oberflächenexpression wurde mit Hilfe eines PE-gekoppelten IL-10R α -Antikörpers mittels Durchflusszytometrie ermittelt (grüne Linie). Zur Kontrolle wurden NK-Zellen mit einem irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps gefärbt (graue Fläche). Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) dienten als Positiv-Kontrolle.

4.1.3 Zusammenfassung der Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2

Die hier durchgeführten CBA-, mRNA- und Immunoblot-Analysen zeigten eine Erhöhung der IL-10 mRNA- und Protein-Expression nach Aktivierung von NK-92 und CAR NK-92/5.28.z Zellen. Dies bestätigt frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe. Zudem wurde eine Aktivierungs-unabhängige, konstitutive Expression des IL-10 Rezeptors IL-10R α auf NK-92 und CAR NK-92/5.28.z Zellen festgestellt. Entsprechend könnte nach Aktivierung der NK-92 Zellen endogen produziertes IL-10 grundsätzlich autokrin auf die Zellen zurückwirken.

4.2 Inhibierung der IL-10 Aktivität durch einen tetravalenten, antagonistischen anti-IL-10 Mini-Antikörper

4.2.1 Generierung und funktionelle Charakterisierung des anti-IL-10 Mini-Antikörpers

Es wurden bereits anti-IL-10 Antikörper beschrieben, die in der Lage sind, IL-10 zu binden und dadurch dessen Aktivität zu inhibieren. Beispielhaft ist der anti-IL-10 Antikörper BT-063 (PCT/EP2010/068569) zu nennen, welcher in einer klinischen Phase-I-Studie in Patienten mit systemischem Lupus erythematodes getestet wurde (Llorente et al., 2000). IgG-Antikörper wie BT-063 besitzen zwei Bindestellen für IL-10, was das therapeutische Potential dieser Moleküle begrenzen kann. Um die neutralisierende Wirkung zu verbessern, wurde daher von Dr. Nina Müller in der Arbeitsgruppe ein rekombinanter anti-IL-10 Mini-Antikörper mit vier Bindestellen für IL-10 generiert (Abb. 4.3 A). Dieser tetravalente Antikörper ist ein über zwei Disulfidbrücken verbundenes Homodimer eines Fusionsproteins bestehend aus einem ersten scFv-Fragment des anti-IL-10 Antikörpers BT-063 am N-Terminus, über eine Gelenkregion verbunden mit den CH2 und CH3 Domänen des humanen Immunglobulin G4 (IgG4) und einem weiteren auf BT-063-basierenden scFv-Antikörperfragment am C-Terminus. Die cDNA des Fusionsproteins wurde in das Expressionsplasmid pcDNA3 kloniert (pcDNA3-BT-063-IgG4-Fc-BT-063). Hierbei wurde eine Sekretion des Fusionsproteins durch ein von der schweren Kette abgeleitetes Signalpeptid am N-Terminus erreicht. Die Expression des Moleküls steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Abb. 4.3 B). Der tetravalente Antikörper wurde nach stabiler Transfektion der Plasmid-DNA in HEK293 Zellen exprimiert und anschließend aus dem Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Protein G Affinitätssäule aufgereinigt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels reduzierender SDS-PAGE, gefolgt von einer Coomassie-Färbung, auf ihren Gehalt an Mini-Antikörper analysiert. In Abb. 4.3 C ist repräsentativ ein Coomassie-gefärbtes Gel einer solchen Analyse gezeigt. Während dabei im Zellkulturüberstand und im Durchfluss der Protein G Säule kein Mini-Antikörper detektiert werden konnte, war eine der erwarteten molekularen Masse des anti-IL-10 Mini-Antikörper-Monomers entsprechende Bande von ca. 90 kDa in den eluierten Fraktionen 1 - 4 nachweisbar. Daneben war in jeder Eluat-Fraktion auch eine schwach angefärbte Bande bei ca. 55 kDa sichtbar, die wahrscheinlich auf mit angereicherte Verunreinigungen aus dem FBS des Zellkulturmediums zurückzuführen ist. Eluat-Fraktionen, die den rekombinanten Mini-Antikörper enthielten, wurden vereinigt und über Nacht gegen 1x DPBS dialysiert. Für den so aufgereinigten anti-IL-10 Mini-Antikörper wurde über den Vergleich mit einer BSA-Standard-Verdünnungsreihe eine Konzentration von ca. 20 µg/ml ermittelt.

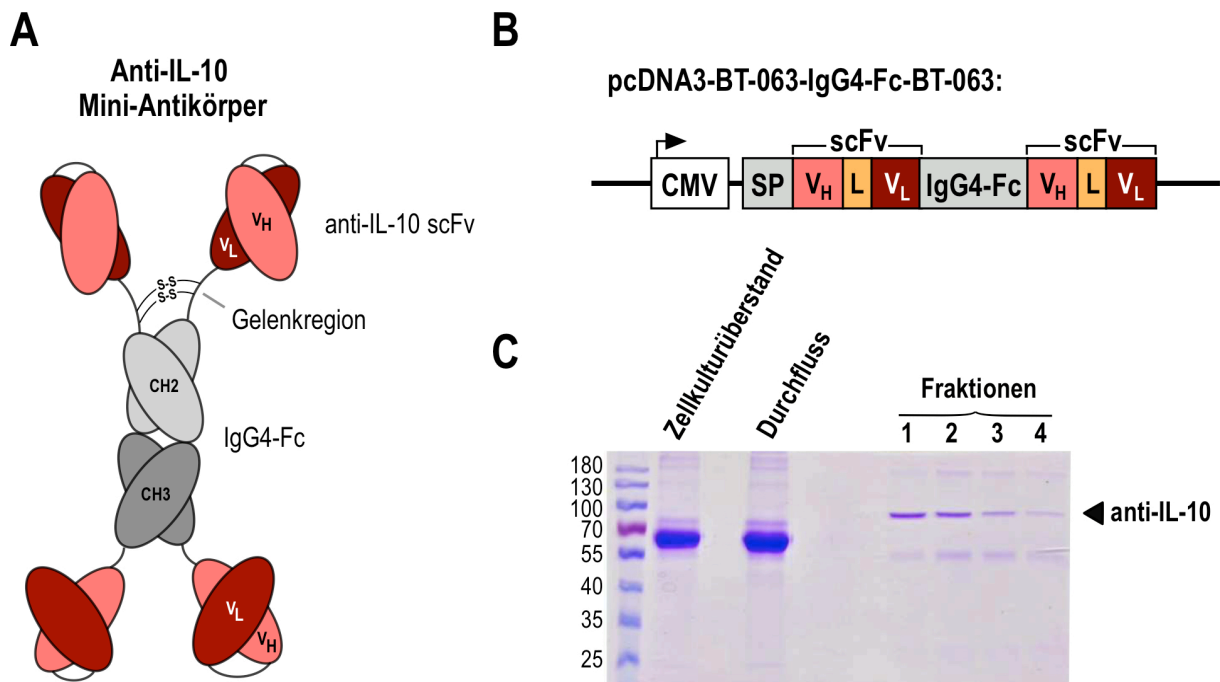


Abb. 4.3: Generierung des rekombinanten anti-IL-10 Mini-Antikörpers. (A) Schematische Darstellung des tetraivalenten anti-IL-10 Mini-Antikörpers. Der tetravalente anti-IL-10 Mini-Antikörper ist ein über Disulfidbrücken-verbundenes Homodimer eines Fusionsproteins bestehend aus einem ersten scFv-Fragment des anti-IL-10 Antikörpers BT-063 am N-Terminus, über eine Gelenkregion verbunden mit den CH2 und CH3 Domänen des humanen Immunglobulin G4 (IgG4) und einem weiteren auf BT-063-basierenden scFv-Antikörperfragment am C-Terminus. **(B) Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsplasmids pcDNA3-BT-063-IgG4-Fc-BT-063.** Der Antikörper wird unter der Kontrolle des CMV (Cytomegalievirus)-Promotors exprimiert. Die Sekretion des Fusionsproteins wurde durch ein von einer schweren Antikörper-Kette abgeleitetes Signalpeptid (SP) am N-Terminus erreicht. Ein scFv-Antikörperfragment besteht aus den variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) des Antikörpers BT-063, die über einen $(G_4S)_3$ -Linker (L) miteinander verknüpft sind. **(C) Analyse der Eluat-Fractionen nach Aufreinigung des anti-IL-10 Mini-Antikörpers.** Die Aufreinigung des Antikörpers aus dem Überstand stabil transfizierter HEK293 Zellen erfolgte über eine Protein G Affinitätsäule. Anschließend wurden die Eluat-Fractionen über SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und Coomassie-Färbung des Gels auf den Mini-Antikörper hin analysiert.

Um die Funktionalität des aufgereinigten anti-IL-10 Mini-Antikörpers zu überprüfen, wurden zunächst Bindungsassays durchgeführt (Abb. 4.4 A, B). Dazu wurden genetisch modifizierte K562 Zellen, welche membranständiges humanes IL-10 auf der Zelloberfläche exprimieren (K562/IL-10TM, siehe 2.12), mit dem anti-IL-10 Mini-Antikörper für 1 h inkubiert (Abb. 4.4 A). Eine Inkubation unmodifizierter K562 Zellen mit dem Mini-Antikörper diene als Kontrolle. Die Detektion des gebundenen Mini-Antikörpers erfolgte mit einem APC-gekoppelten human-spezifischen Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass der Mini-Antikörper spezifisch an das membranständige IL-10 auf der Oberfläche von K562/IL-10TM Zellen band, wohingegen unmodifizierte K562 Zellen nicht gefärbt wurden. Als weiterer Bindungsassay wurde ein ELISA durchgeführt, um die Antigenspezifität des Mini-Antikörpers zu bestätigen (Abb. 4.4 B). Zunächst wurde eine ELISA-Platte über Nacht bei 4°C mit humanem IL-10 beschichtet. Eine mit humanem IL-2 beschichtete Mikrowellplatte diene

als Negativ-Kontrolle. Nachdem unspezifische Bindungsstellen abgesättigt waren, erfolgte die Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des anti-IL-10 Mini-Antikörpers, gefolgt von einem HRP-gekoppelten anti-human IgG Detektionsantikörper. Nach Zugabe von TMB-Substrat wurde die Enzymaktivität der HRP photometrisch erfasst, welche weitgehend linear mit der Menge des gebundenen Mini-Antikörpers ansteigt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass der Mini-Antikörper spezifisch humanes IL-10 erkannte, wohingegen keine unspezifische Bindung an IL-2 beobachtet wurde. Dies bestätigte die Spezifität des gereinigten Mini-Antikörpers für IL-10.

Um die neutralisierende Aktivität des anti-IL-10 Mini-Antikörpers zu ermitteln, wurde die Inhibierung der IL-10-vermittelten Aktivierung des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) in IL-10R α -positiven NK-92 Zellen untersucht (Abb. 4.4 C). Dazu wurden NK-92 Zellen über Nacht ohne IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit IL-10 in Ab- oder Anwesenheit des anti-IL-10 Mini-Antikörpers für 20 min inkubiert. Zelllysate wurden hergestellt und die STAT3-Phosphorylierung wurde mittels Immunoblot mit einem Phospho-STAT3-spezifischen Antikörper analysiert. Zusätzlich wurde STAT3 Gesamt-Protein in den Lysaten untersucht. Im Immunoblot zeigte sich, dass in allen Proben eine vergleichbare Menge an STAT3 enthalten war. Dabei ist die obere Bande der Isoform STAT3 α (86 kDa) und die untere Bande der verkürzten Isoform STAT3 β (79 kDa) zuzuordnen. In Abwesenheit des anti-IL-10 Mini-Antikörpers induzierte das zugegebene IL-10 die Phosphorylierung von STAT3. Auch hier sind beide Isoformen bei 86 kDa und 79 kDa nachweisbar. In Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des anti-IL-10 Mini-Antikörpers erfolgte dagegen keine IL-10-vermittelte STAT3-Phosphorylierung, vergleichbar der ohne IL-10 inkubierten NK-92 Kontrolle.

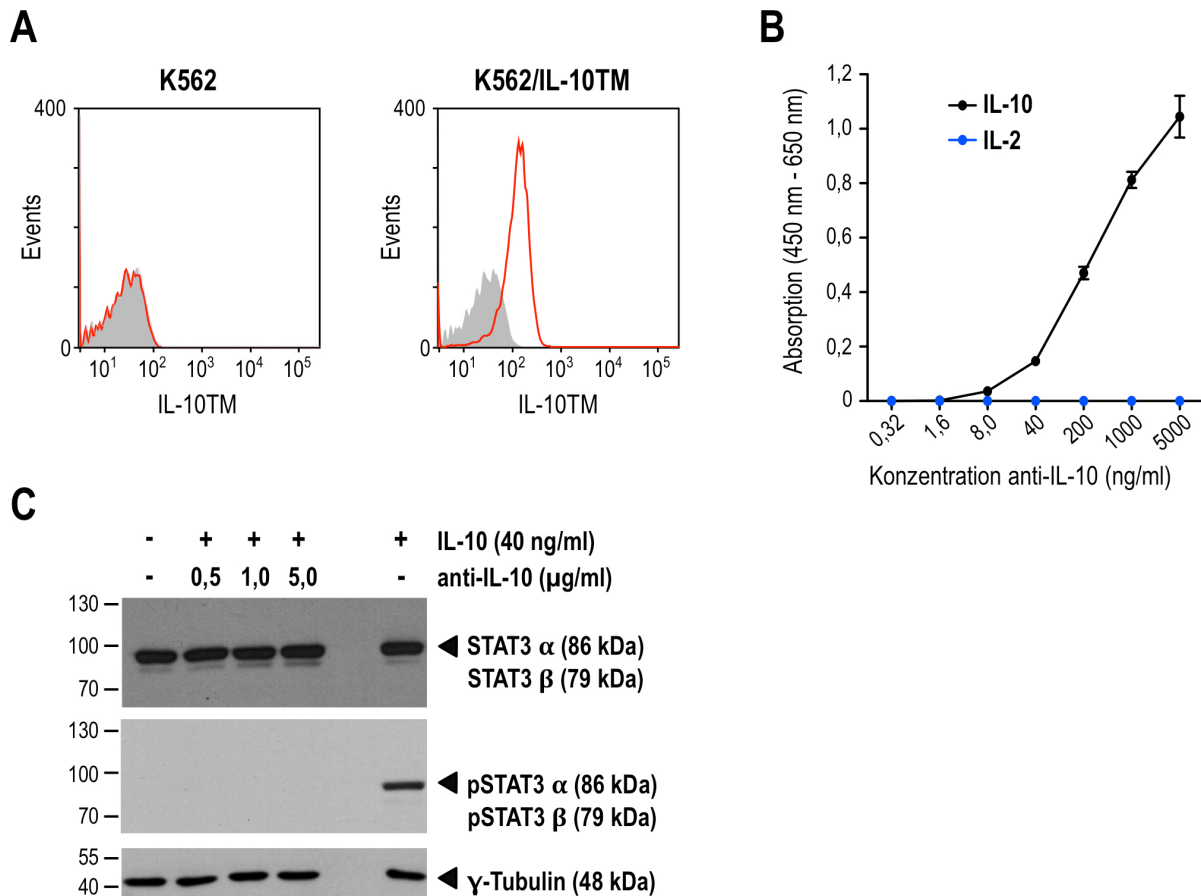


Abb. 4.4: Funktionelle Charakterisierung des anti-IL-10 Mini-Antikörpers. (A) Untersuchung der Antigen-Bindung mittels Durchflusszytometrie. 5×10^5 genetisch modifizierte K562/IL-10TM oder unmodifizierte K562 Zellen wurden in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen und mit 0,25 μ g/ml anti-IL-10 Mini-Antikörper inkubiert. Die Detektion des gebundenen Mini-Antikörpers erfolgte mit einem APC-gekoppelten human-spezifischen Sekundärantikörper mittels Durchflusszytometrie (rote Linie). Zellen, welche nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, dienten als Kontrolle (graue Fläche). **(B) Nachweis der Antigen-spezifität mittels ELISA.** ELISA-Platten wurde entweder mit 5 μ g/ml IL-10 (schwarze Linie) oder IL-2 (blaue Linie) über Nacht bei 4°C beschichtet. Es folgte eine Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des anti-IL-10 Mini-Antikörpers und die Detektion des gebundenen Fusionsproteins über einen HRP-gekoppelten human-spezifischen Sekundärantikörper und das HRP-Substrat TMB. Die Signale wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm gemessen, von denen die Werte einer Referenzmessung bei 650 nm subtrahiert wurden. **(C) Neutralisierende Aktivität des anti-IL-10 Mini-Antikörpers.** Verschiedene Konzentrationen des Mini-Antikörpers wurden mit 40 ng/ml humanem IL-10 ko-inkubiert. Anschließend wurden NK-92 Zellen, die zuvor über Nacht in Medium ohne IL-2 kultiviert waren, entweder mit dem Mix oder mit IL-10 allein für 20 min bei 37°C behandelt. Die Zellen wurden lysiert, je 30 μ g Gesamt-Protein wurden in einem 7,5%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Menge an STAT3 Gesamt-Protein (STAT3) bzw. seiner phosphorylierten (Tyr705) Form (pSTAT3) wurde über einen jeweils spezifischen Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde γ -Tubulin detektiert. Zum Vergleich ist die Position ausgewählter Proteinstandards mit der jeweiligen molekularen Masse in kDa eingezeichnet.

4.2.2 Einfluss des anti-IL-10 Mini-Antikörpers auf die zytotoxische Aktivität von NK-92 Zellen

Im Anschluss an die funktionelle Charakterisierung wurde überprüft, ob der anti-IL-10 Mini-Antikörper einen Einfluss auf die natürliche bzw. spezifisch über den CAR vermittelte Zytotoxizität von NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen ausübt (Abb. 4.5). Als etablierte Standard-Zielzelllinie für die Untersuchung der natürlichen Zytotoxizität von NK-Zellen wurden K562

Zellen herangezogen. K562 sind Erythroleukämie-Zellen, die keine MHC-Klasse I Moleküle exprimieren (Gong et al., 1994; Lozzio and Lozzio, 1975). MDA-MB453 und MDA-MB468 sind humane ErbB2-überexprimierende (MDA-MB453) bzw. ErbB2-negative (MDA-MB468) Mammakarzinomzelllinien, welche für die Untersuchung der CAR-vermittelten spezifischen Zytotoxizität von NK-92/5.28.z Zellen genutzt werden können (Schonfeld et al., 2015). Zunächst wurden die Tumorzellen (Zielzellen) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein Violet (CV) gefärbt und mit NK-92 Zellen (Effektorzellen) in unterschiedlichen Effektor- zu Zielzell (*Target*, E/T)-Verhältnissen in Ab- oder Anwesenheit von 2 µg/ml des anti-IL-10 Mini-Antikörpers für 2 h ko-inkubiert. Um einen möglichen Einfluss der IgG4-Fc-Domäne ausschließen zu können, wurde als Kontrolle ein Ansatz mit einem irrelevanten IgG4-Fc Protein der gleichen Konzentration mitgeführt. Nach der Inkubation wurden tote Zellen innerhalb der Ko-Kultur mit einer Propidiumiodid (PI)-Lösung gefärbt. Lysierte Tumorzellen wurden am FACSCanto II Durchflusszytometer als doppelt positiv für CV und PI identifiziert.

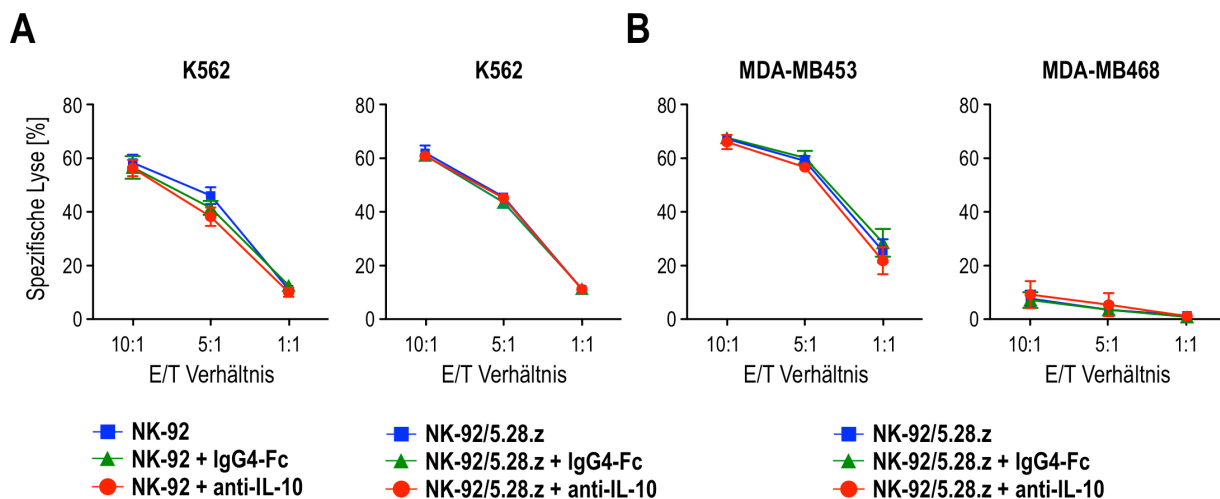


Abb. 4.5: Analyse der Zytotoxizität parentaler und ErbB2-spezifischer CAR NK-92 Zellen gegenüber etablierten Tumorzelllinien in Ab- oder Anwesenheit des anti-IL-10 Mini-Antikörpers. Die Tumorzellen wurden mit Calcein Violet (CV) gefärbt und mit NK-92 Zellen in den gezeigten Effektor/*Target* (E/T)-Verhältnissen in Ab- oder Anwesenheit von 2 µg/ml des anti-IL-10 Mini-Antikörpers für 2 h ko-inkubiert. Als Kontrolle wurden Ansätze mit einem irrelevanten IgG4-Fc Kontroll-Protein der gleichen Konzentration mitgeführt. Lysierte Tumorzellen wurden im Anschluss mit einer Propidiumiodid (PI)-Lösung angefärbt. Abgetötete Tumorzellen wurden mittels Durchflusszytometrie als doppelt positiv für CV und PI identifiziert. Von den erhaltenen Werten wurde die Prozentzahl der spontanen Lyse nach Inkubation der Tumorzellen ohne NK-Zellen subtrahiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. **(A) Einfluss des Mini-Antikörpers auf die natürliche Zytotoxizität von NK-92 Zellen.** Als Standard-Zielzelllinie für die Analyse der natürlichen Zytotoxizität von NK-92 Zellen wurden K562 Zellen herangezogen. **(B) Einfluss des Mini-Antikörpers auf die CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität von NK-92/5.28.z Zellen.** ErbB2-überexprimierende MDA-MB453 Mammakarzinomzellen wurden als Zielzelllinie genutzt. ErbB2-negative MDA-MB468 Zellen dienen als Kontrolle.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass K562 Tumorzellen von parentalen NK-92 Zellen und ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z Zellen in Ab- oder Anwesenheit des anti-IL-10 Mini-Antikörpers oder des IgG4-Fc Kontroll-Proteins gleichermaßen lysiert wurden (Abb. 4.5 A). So

betrug bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 der Anteil durch parentale NK-92 lysierter K562 Zellen durchschnittlich $58,3\% \pm 2,3\%$, in Anwesenheit des anti-IL-10 Mini-Antikörpers $56,2\% \pm 2,4\%$ und des IgG4-Fc Proteins $56,5\% \pm 3,4\%$. Für die E/T-Verhältnisse von 5:1 und 1:1 wurden ebenfalls kaum Unterschiede in der Lyse-Rate der K562 Zellen beobachtet. Gleiches zeigte sich für den Anteil durch NK-92/5.28.z Zellen lysierter K562 Zellen. Bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 wurden K562 Zellen von NK-92/5.28.z Zellen zu $62\% \pm 2,2\%$, in Anwesenheit des IgG4-Fc Proteins zu $61,1\% \pm 1,3\%$ und in Anwesenheit des anti-IL-10 Mini-Antikörpers zu $60,9\% \pm 0,6\%$ lysiert. Die für die Analyse der CAR-vermittelten spezifischen Zytotoxizität genutzten ErbB2-überexprimierenden MDA-MB453 Tumorzellen wurden von NK-92/5.28.z Zellen zu $67\% \pm 0,9\%$ bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 abgetötet (Abb. 4.5 B). Diese hohe Lyse blieb von der Anwesenheit des IgG4-Fc Proteins ($67,5\% \pm 1,3\%$) oder des anti-IL-10 Mini-Antikörpers ($65,8\% \pm 2,1\%$) unbeeinflusst. ErbB2-negative MDA-MB468 Zellen wurden weder in Ab- noch in Anwesenheit des Mini-Antikörpers oder des IgG4-Fc Kontroll-Proteins von NK-92/5.28.z Zellen abgetötet.

4.2.3 Zusammenfassung der Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2

Ein in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konstruierter antagonistischer anti-IL-10 Mini-Antikörper mit vier Bindestellen für IL-10 wurde in HEK293 Zellen exprimiert und erfolgreich aus dem Kulturüberstand gereinigt. Die Spezifität des gereinigten Mini-Antikörpers für IL-10 wurde mittels Durchflusszytometrie und ELISA bestätigt und seine IL-10-neutralisierende Aktivität über die Hemmung der Aktivierung des STAT3-Signalweges in NK-92 Zellen nachgewiesen. In einem 2 h Zytotoxizitätsassay hatte der Mini-Antikörper keinen Einfluss auf die natürliche und CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität von parentalen NK-92 bzw. NK-92/5.28.z Zellen.

4.3 Hemmung der IL-10 Expression in NK-92 Zellen

Neben der Möglichkeit, das von NK-92 Zellen sekretierte IL-10 durch die Zugabe eines antagonistischen anti-IL-10 Mini-Antikörpers zu neutralisieren, wurden Ansätze untersucht, die die IL-10 Expression bzw. Sekretion bereits in den NK-92 Zellen unterbinden. Dazu zählten eine shRNA-vermittelte Herunterregulation der IL-10 Expression auf mRNA-Ebene, ein CRISPR/Cas9-vermittelter IL-10 Gen-*knockout* auf DNA-Ebene und ein *knockdown* der IL-10 Sekretion auf Protein-Ebene mittels intrazellulär exprimierter anti-IL-10 scFv-Antikörper.

4.3.1 RNAi-vermitteltes *silencing* der IL-10 mRNA durch das Einbringen einer spezifischen shRNA

Zunächst wurde das RNAi (Interferenz)-vermittelte *silencing* der IL-10 mRNA unter der Verwendung einer spezifischen *short hairpin* RNA (shRNA) getestet. Sechs lentiviral kodierte shRNAs, die gegen unterschiedliche Bereiche der IL-10 mRNA gerichtet waren, wurden

ausgewählt und auf ihre Effektivität hin untersucht. Je ein GIPZ-shRNA Konstrukt wurde nach lentiviraler Transduktion konstitutiv in den NK-92 Zellen exprimiert. Anschließend wurde der durch die sechs IL-10 shRNAs vermittelte IL-10 mRNA *knockdown* in NK-92 Zellen verglichen (Daten nicht gezeigt). Für nachfolgende Untersuchungen wurde die IL-10-shRNA ausgewählt, die den stärksten *knockdown*-Effekt auf mRNA-Ebene bewirkte (Sequenz der shRNA siehe 2.8).

Das verwendete lentivirale GIPZ-shRNA Vektorsystem kodiert unter der Kontrolle des CMV Promotors die Sequenz des Fluoreszenzmarkers tGFP (Abb. 4.6 A). Dem folgt eine IRES-Sequenz, ein Puromycin-Resistenzgen und die shRNA-Sequenz. Zusätzlich wurde ein pGIPZ-Transferplasmid genutzt, welches eine *scrambled control* shRNA kodiert. Dabei handelt es sich um eine Kontroll-shRNA (*Control*-shRNA, Ctrl-shRNA), welche keine Komplementarität zu einer existierenden humanen mRNA besitzt und als Negativ-Kontrolle fungiert. Damit sollten IL-10-shRNA-spezifische Effekte als solche identifiziert und Veränderungen des Phänotyps der Zellen allein aufgrund der Transduktion ausgeschlossen werden. Es folgte die Herstellung VSV-G pseudotypisierter lentiviraler Vektorpartikel, indem HEK293T Zellen mit dem pGIPZ-IL-10-shRNA- oder dem Kontroll-Transferplasmid zusammen mit dem Verpackungsplasmid pCMVΔR8.91 und dem Hüllplasmid pMD2.G ko-transfiziert wurden. Der Vektorpartikel-haltige Kulturüberstand wurde im Beisein von Polybren und dem Multi-Kinase-Inhibitor BX795 auf die NK-92 Zellen gegeben. Um die Population der transduzierten Zellen anzureichern, wurden die NK-92 Zellen mit 2,5 µg/ml Puromycin für sieben Tage selektioniert und anschließend anhand ihrer tGFP-Expression an einem FACSAria Zellsortierer in einem Durchgang von tGFP-negativen Zellen getrennt. Der so entstandene Pool an transduzierten Zellen wurde expandiert und die Zellen wurden auf die Effizienz des IL-10 mRNA *knockdowns* hin untersucht (Abb. 4.6 B). Dazu wurden shRNA-exprimierende parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression der IL-10 mRNA wurde über IL-10-spezifische Primer mittels quantitativer Echtzeit-PCR analysiert. Die relative mRNA-Expression unmodifizierter NK-92 Zellen wurde als 1 gesetzt und die Werte shRNA-transduzierter NK-Zellen wurden relativ dazu berechnet.

Es zeigte sich, dass die Expression der IL-10-shRNA zu einer Reduktion der IL-10 mRNA Menge um 77% in parentalen und um 83% in ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen im Vergleich zu Ctrl-shRNA-exprimierenden Zellen führte. Die Ctrl-shRNA hingegen hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die relative IL-10 mRNA Menge im Vergleich zu unmodifizierten NK-Zellen.

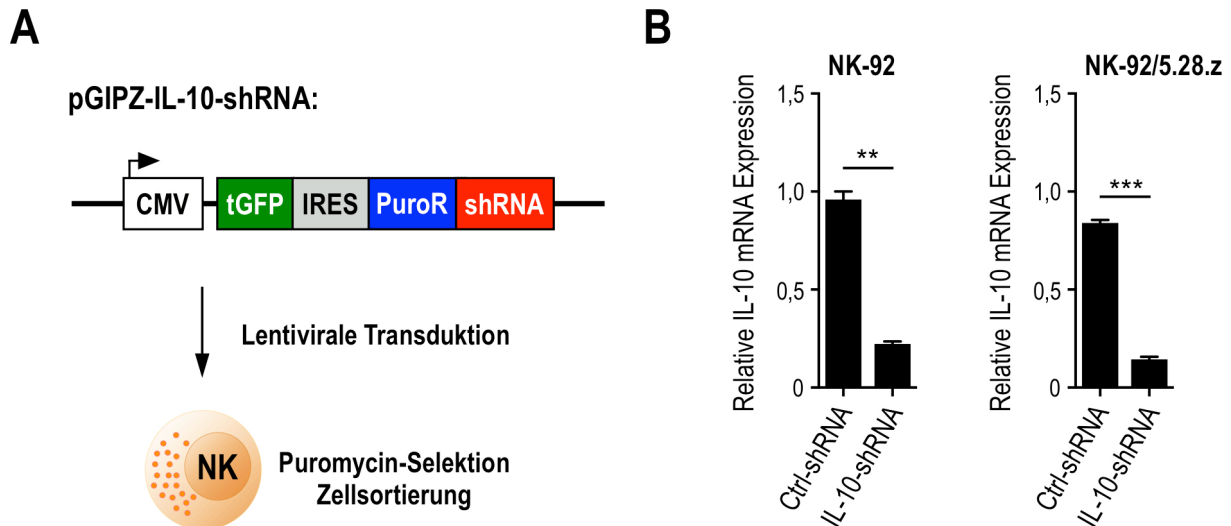


Abb. 4.6: Schematischer Aufbau des lentiviralen GIPZ-shRNA Vektorsystems, Gewinnung shRNA-transduzierter NK-92 Zellen und Auswirkungen auf die IL-10 mRNA-Expression. (A) Schematische Darstellung des lentiviralen shRNA-Expressionsvektors GIPZ und Anreicherung transduzierter Zellen. Das hier genutzte GIPZ Vektorsystem kodiert den Fluoreszenzmarker tGFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Über eine IRES (*internal ribosome entry site*)-Sequenz wird gleichzeitig ein Puromycin-Resistenzgen und die shRNA-Sequenz exprimiert. Parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen wurden mit Vektorpartikel-haltigem Kulturüberstand im Beisein von Polybren und dem Inhibitor BX795 transduziert. Erfolgreich transduzierte NK-92 Zellen wurden über Puromycin-Selektion und durchflusszytometrische Sortierung angereichert. **(B) IL-10 mRNA-Expression shRNA-transduzierter NK-92 Zellen nach Stimulierung mit PMA und Ionomycin.** 2×10^6 shRNA-transduzierte NK-92 Zellen wurden mit PMA und Ionomycin (Endkonzentration je $1 \mu\text{g/ml}$) für 5 h stimuliert. Unmodifizierte NK-Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf die IL-10 Expression hin analysiert. Für die relative Quantifizierung wurde die IL-10 Expression auf das konstant exprimierte Referenzgen $\beta 2$ -Mikroglobulin normalisiert. Anschließend wurde die relative mRNA-Expression unmodifizierter NK-92 Zellen als 1 gesetzt und die Werte shRNA-transduzierter NK-Zellen wurden relativ dazu berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$. tGFP: *turbo green fluorescent protein*.

Um die Funktionalität der gegen die IL-10 mRNA gerichteten shRNA in NK-92 Zellen auf Protein-Ebene zu bestätigen, wurde die IL-10 Produktion nach Stimulierung mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von GolgiPlug mittels Immunoblot untersucht (Abb. 4.7, oben). Weiterhin wurde die Ausschüttung des Zytokins durch unmodifizierte, IL-10-shRNA- und Ctrl-shRNA-exprimierende NK-92 Zellen nach Zielzellkontakt mit Hilfe eines *Cytometric Bead Array* verglichen (Abb. 4.7, unten). Sowohl für parentale (Abb. 4.7 A) als auch für ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen (Abb. 4.7 B) konnte jeweils für die unmodifizierten und Ctrl-shRNA-exprimierenden Zellen eine spezifische Bande für IL-10 im Immunoblot detektiert werden. Dabei war die Menge des nachgewiesenen Proteins annähernd gleich. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde bei IL-10-shRNA-exprimierenden NK-92 Zellen dagegen eine deutlich verminderte Expression des IL-10 Proteins nachgewiesen.

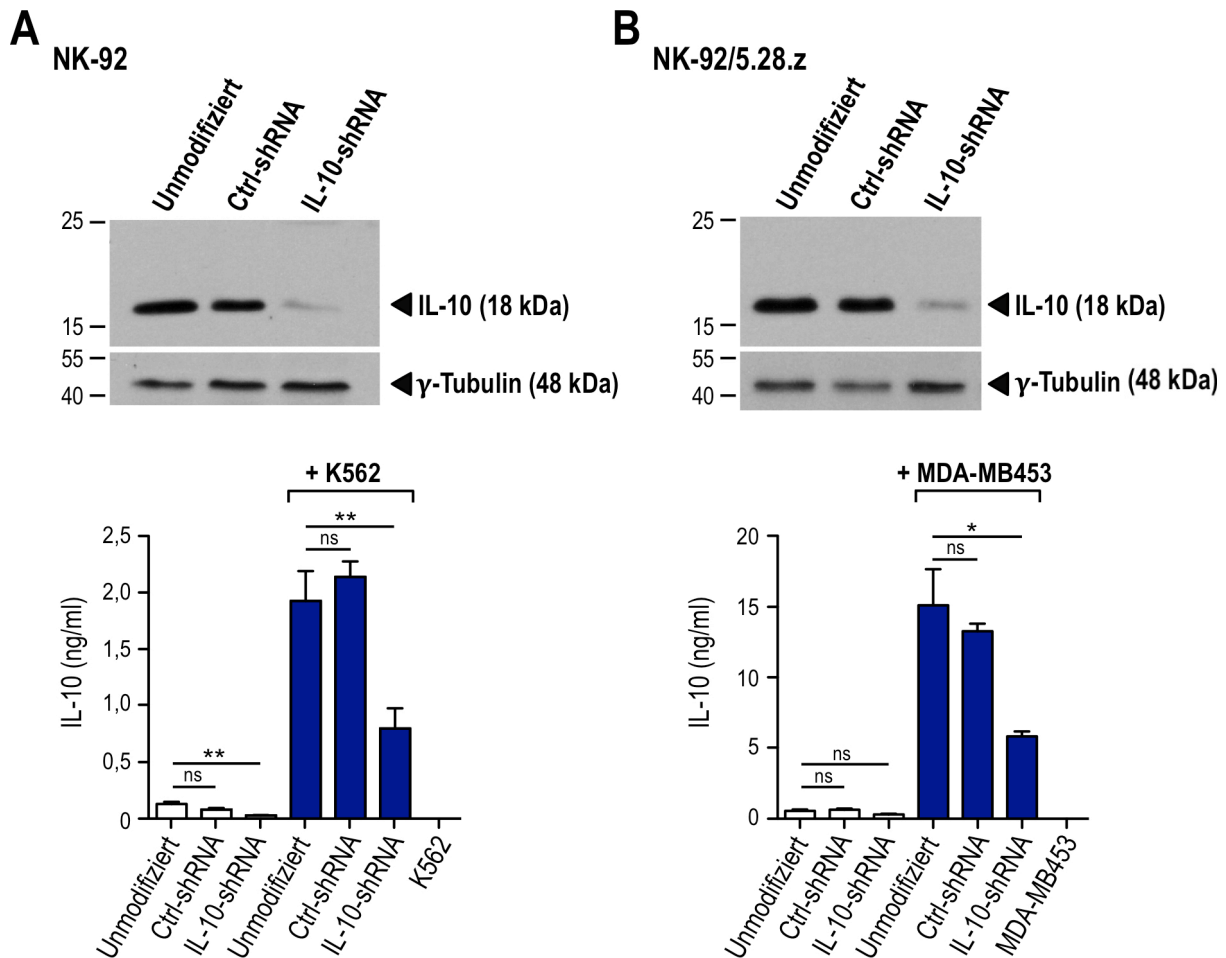


Abb. 4.7: shRNA-vermittelte Reduktion der IL-10 Expression auf Protein-Ebene. Oben: Unmodifizierte und mit shRNA-Konstrukten transduzierte parentale (A) und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen (B) wurden mit PMA und Ionomycin (Endkonzentration je 1 µg/ml) in Anwesenheit von GolgiPlug für 5 h stimuliert. Je 20 µg Gesamt-Zelllysate wurden in einem 15%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion von IL-10 erfolgte mit einem IL-10-spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle wurde γ-Tubulin nachgewiesen. Zum Vergleich ist die Position ausgewählter Proteinstandards mit der jeweiligen molekularen Masse in kDa eingezeichnet. Unten: Parentale (A) oder ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen (B) wurden im Verhältnis 1:1 mit K562 oder MDA-MB453 Tumorzellen ko-inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels *Cytometric Bead Array* auf das Vorhandensein von IL-10 hin analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten nach Abzug der Werte von zellfreiem X-VIVO⁺⁺ Medium. **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$.

Die Ergebnisse des *Cytometric Bead Array* bestätigten die Resultate der Immunoblot-Analysen. So wurde für die unmodifizierten parentalen NK-92 Zellen im nicht aktivierten Zustand eine IL-10 Konzentration von 0,12 ng/ml ermittelt, die sich nur unwesentlich von der gemessenen IL-10 Konzentration von 0,07 ng/ml für die Ctrl-shRNA-exprimierenden Zellen unterschied. Nach Aktivierung mit K562 Zellen produzierten unmodifizierte (1,92 ng/ml) und mit Ctrl-shRNA-transduzierte (2,13 ng/ml) Zellen annähernd gleiche Mengen an IL-10. IL-10-shRNA-exprimierende NK-92 Zellen sekretierten dagegen im nicht aktivierten (0,02 ng/ml) und im aktivierten Zustand (0,79 ng/ml) eine um 80% (nicht aktiviert) bzw. 60% (nach Aktivierung) geringere Menge an IL-10 in den Kulturüberstand. Eine ca. 60%ige Reduktion der IL-10 Konzentration wurde im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen (nicht aktiviert:

0,51 ng/ml, nach Aktivierung: 15,0 ng/ml) auch für IL-10-shRNA-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen (nicht aktiviert: 0,23 ng/ml, nach Aktivierung: 5,78 ng/ml) beobachtet. Dabei hatte die Expression der Ctrl-shRNA (nicht aktiviert: 0,58 ng/ml, nach Aktivierung: 13,2 ng/ml) keine signifikante Auswirkung auf die IL-10 Produktion verglichen mit unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen.

4.3.2 Abschalten des IL-10 Gens durch Gen-Editierung mit CRISPR/Cas9

Das CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)/Cas (*CRISPR-associated*)-System dient Bakterien als adaptiver Abwehrmechanismus, um sich vor Virusinfektionen und Fremd-DNA zu schützen (Gasiunas et al., 2012). In den letzten Jahren wurde das CRISPR/Cas9-System zu einem nützlichen Werkzeug entwickelt, das auch in Säugerzellen die gezielte Manipulation genomischer DNA-Sequenzen oder eine Veränderung der Regulation der Genexpression erlaubt.

In dieser Arbeit wurde das LentiCRISPRv2 Vektorsystem mit zwei Expressionskassetten eingesetzt, um einen IL-10 Gen-*knockout* in NK-92 Zellen zu induzieren (Abb. 4.8). Zum einen kodiert der genutzte lentivirale Vektor die *guide* RNA (gRNA), welche unter der Kontrolle des U6-Promotors steht, zum anderen enthält der Vektor die Sequenz der Cas9-Nuklease aus *Streptococcus pyogenes*, deren Expression durch den EF-1 α -Promotor gesteuert wird. Zur immunologischen Detektion ist das Cas9-Protein C-terminal mit einem Flag-Tag versehen. Über zwei 2A Peptide sind die Sequenzen des Markers EGFP und des Puromycin-Resistenzgens mit der Cas9-Sequenz verknüpft. Insgesamt wurden vier IL-10-spezifische gRNAs (Sequenzen siehe 2.8) mit Hilfe eines Online-Tools (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design-crisprai>) entworfen, die an vier verschiedene Positionen innerhalb der Exons 1, 3 und 5 des humanen IL-10 Gens hybridisieren. Je eine gRNA wurde in den lentiviralen Transfervektor LentiCRISPRv2-GFP-Puro inseriert. Die vollständigen Konstrukte wurden von Dr. Manuel Kaulich (Institut für Biochemie II, Goethe-Universität, Frankfurt am Main) bereitgestellt. Da Lentiviren ihr Provirus-Genom präferenziell in transkriptionell-aktive Bereiche integrieren, ist eine Veränderung des Phänotyps der Zellen allein aufgrund der Vektorintegration nicht auszuschließen (Ciuffi, 2008). Daneben war es auch von Interesse, mögliche, bereits durch die Expression der Cas9-Nuklease allein entstehende Effekte ausschließen zu können. Daher wurde als Kontrolle ein LentiCRISPRv2-GFP-Puro-Vektorkonstrukt mitgeführt, welches nur die Cas9-Nuklease aber keine gRNA kodiert, um IL-10-CRISPR/Cas9-spezifische Effekte identifizieren zu können. VSV-G pseudotypisierte lentivirale Vektorpartikel wurden, wie in 3.2.8 beschrieben, in HEK293T Zellen produziert. Parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen wurden im Beisein von Polybren und dem Multi-Kinase-Inhibitor BX795 mit dem Vektorpartikel-haltigen Kulturüberstand transduziert. Die Transduktionseffizienz der NK-92 Zellen betrug 2% - 8%

(Daten nicht gezeigt) und war damit sehr gering. Um erfolgreich transduzierte Zellen anzureichern, wurden die Zellpopulationen zunächst mit 2,5 µg/ml Puromycin für sieben Tage selektioniert und anschließend anhand ihrer EGFP-Expression an einem FACS Aria Zellsortierer in einem Durchgang von EGFP-negativen Zellen getrennt. Der so entstandene Zellpool wurde expandiert und die Zellen wurden auf einen erfolgten IL-10 *knockout* hin analysiert. Die Untersuchung der Zytokinsekretion nach Zielzellkontakt der modifizierten NK-92 Zellen zeigte, dass die IL-10 Sekretion in den Pools der pLentiCRISPRv2-GFP-Puro-exprimierenden NK-Zellen nur zu 86% (parentale NK-92 Zellen) bzw. 88% (NK-92/5.28.z Zellen) vermindert war, was auf einen unvollständigen IL-10 *knockout* innerhalb der Zellpopulation hindeutete (Daten nicht gezeigt). Daher wurden in einem weiteren Schritt aus dem Zellpool Einzelzellen durchflusszytometrisch anhand ihrer EGFP-Expression isoliert (Einzelzellsortierung), expandiert und auf einen erfolgreichen kompletten IL-10 Gen-*knockout* hin untersucht. Auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse wurde jeweils ein Zellklon der CRISPR/Cas9-editierten parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen für die nachfolgend dargestellten, detaillierten Funktionsanalysen ausgewählt (Abb. 4.8).

pLentiCRISPRv2-GFP-Puro:

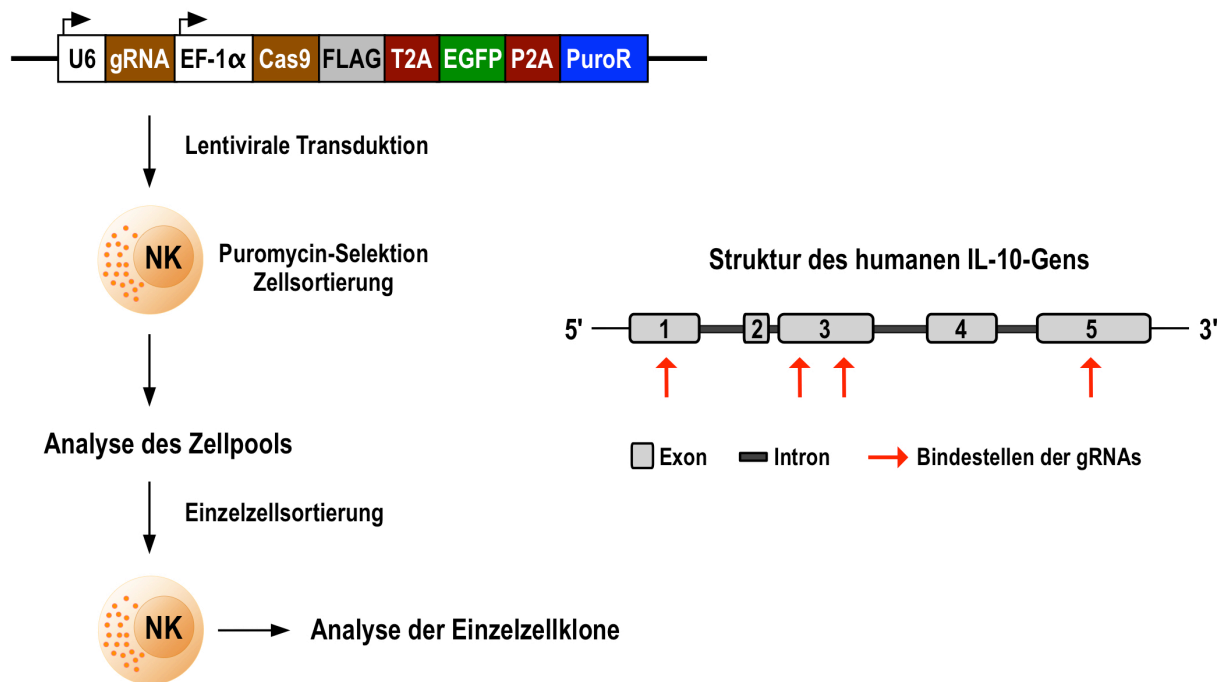


Abb. 4.8: Schematischer Aufbau des lentiviralen LentiCRISPRv2 Vektorsystems, Arbeitsablauf für die Gewinnung transduzierter Einzelzellen und Darstellung des humanen IL-10 Gens mit Bindestellen der IL-10-spezifischen gRNAs. Das hier genutzte LentiCRISPRv2 Vektorsystem besitzt zwei Expressionskassetten, welche die *guide RNA* (gRNA) unter der Kontrolle des U6-Promotors und die Cas9-Nuklease, welche durch den EF-1 α -Promotor gesteuert wird, kodieren. Das Cas9-Protein ist über einen Flag-Tag detektierbar. Weiterhin sind im Vektor die kodierende Sequenz von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und ein Puromycin-Resistenzgen enthalten, die über eine T2A- bzw. P2A-Prozessierungssequenz mit der Cas9-Sequenz verbunden sind. Je eine der vier IL-10-spezifischen gRNAs wurde in den Transfervektor pLentiCRISPRv2-GFP-Puro eingefügt. Die gRNAs wurden so entworfen, dass sie spezifisch an definierte Sequenzen der Exons 1, 3 und 5 innerhalb des humanen IL-10 Gens binden (rechts). Ein LentiCRISPRv2-GFP-Puro-Transferplasmid, welches nur die Cas9-Nuklease kodiert, diente als Kontrolle. Parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen wurden mit Vektorpartikel-haltigem Kulturüberstand im Beisein von Polybren und dem Inhibitor BX795 transduziert. Erfolgreich transduzierte NK-92 Zellen wurden über Puromycin-Selektion und durchflusszytometrische Sortierung angereichert. Nach Analyse des erhaltenen Zellpools wurden aus diesem Einzelzellen durchflusszytometrisch anhand ihrer EGFP-Expression isoliert, expandiert und analysiert.

Zur Überprüfung des CRISPR/Cas9-vermittelten IL-10 Gen-*knockouts* in Einzelzellklonen (NK-92/IL-10-CRISPR/Cas9, NK-92/5.28.z/IL-10-CRISPR/Cas9) wurden die NK-92 Zellen mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von GolgiPlug, einem Inhibitor des intrazellulären Proteintransports, stimuliert (Abb. 4.9, oben). Unmodifizierte und Cas9-exprimierende Zellen dienten als Kontrollen. Nachfolgend wurden Zelllysate hergestellt, welche mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit einem IL-10-spezifischen Antikörper auf die IL-10 Proteinexpression hin untersucht wurden. Im Immunoblot zeigte sich, dass in unmodifizierten und Cas9-exprimierenden parentalen NK-92 Zellen IL-10 in vergleichbaren Mengen nachweisbar war (Abb. 4.9 A). Hingegen wurde kein IL-10 in IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierenden Zellen detektiert, was auf einen erfolgreichen *knockout* des IL-10 Gens im ausgewählten NK-92 Klon

schließen lässt. Gleiches wurde für den entsprechenden NK-92/5.28.z Klon beobachtet (Abb. 4.9 B).

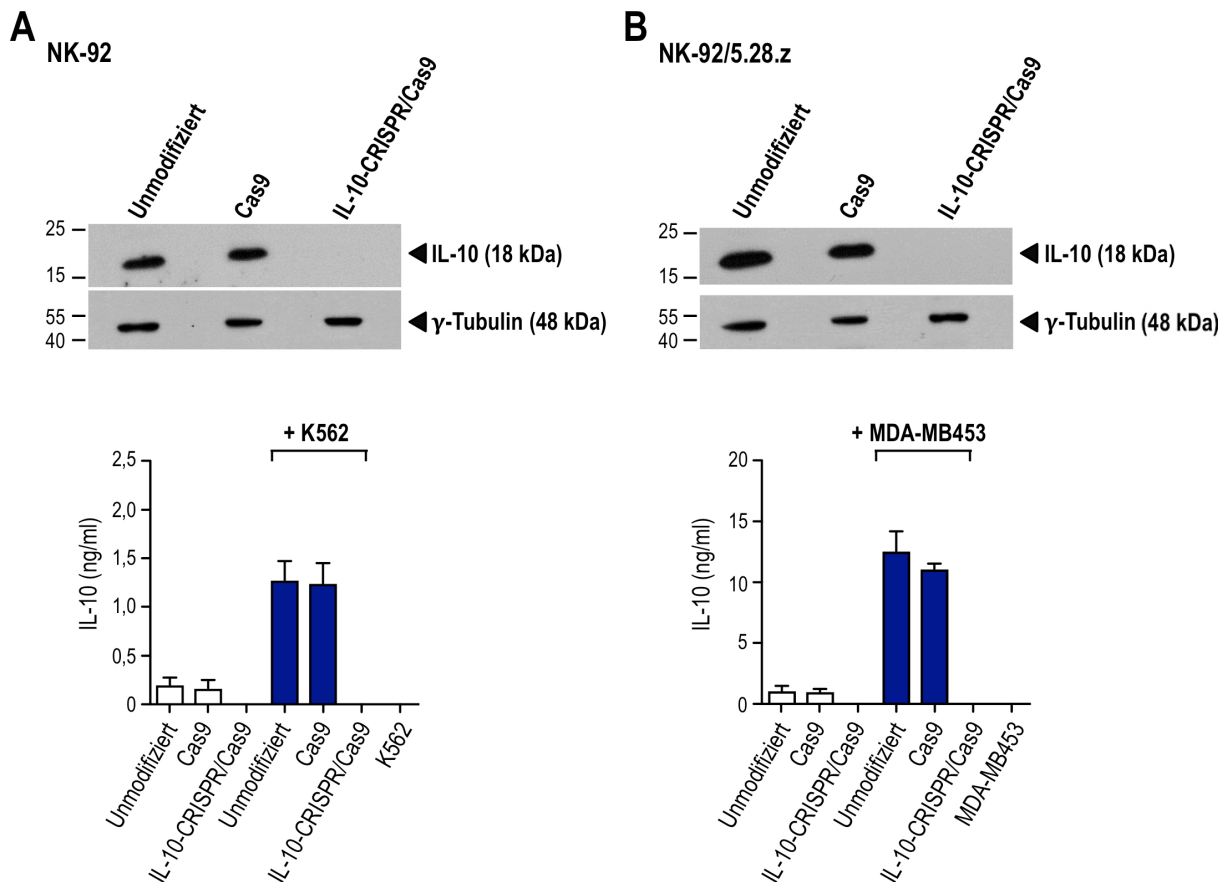


Abb. 4.9: Nachweis des CRISPR/Cas9-vermittelten IL-10 Gen-*knockouts*. Oben: Unmodifizierte und mit Cas9-Vektoren transduzierte parentale (A) und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen (B) wurden mit PMA und Ionomycin (Endkonzentration je 1 µg/ml) in Anwesenheit von GolgiPlug für 5 h stimuliert. Je 20 µg Gesamt-Zelllysate wurden in einem 15%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion von IL-10 erfolgte mit einem IL-10-spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle wurde γ-Tubulin nachgewiesen. Zum Vergleich ist die Position ausgewählter Proteinstandards mit der jeweiligen molekularen Masse in kDa eingezeichnet. Unten: Parentale (A) oder ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen (B) wurden im Verhältnis 1:1 mit K562 oder MDA-MB453 Tumorzellen ko-inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels *Cytometric Bead Array* auf das Vorhandensein von IL-10 hin analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten nach Subtraktion der Werte von zellfreiem X-VIVO⁺⁺ Medium.

Weiterhin wurde die IL-10 Ausschüttung der NK-92 Zellen nach Zielzellkontakt in den Zellkulturüberstand mit Hilfe eines *Cytometric Bead Array* untersucht (Abb. 4.9, unten). Es zeigte sich, dass nicht aktivierte, unmodifizierte und Cas9-exprimierende parentale NK-92 Zellen wenig IL-10 in den Überstand sekretierten (0,20 ng/ml und 0,17 ng/ml). Wurden NK-Zellen mit K562 Zellen ko-inkubiert, so erhöhte sich die IL-10 Konzentration im Überstand auf 1,28 ng/ml bei unmodifizierten und auf 1,25 ng/ml bei Cas9-exprimierenden Zellen. Bei NK-92 Zellen, welche mit dem IL-10-spezifischen CRISPR/Cas9 System modifiziert waren, konnte weder im nicht aktivierten Zustand noch nach Aktivierung mit K562 Zellen eine IL-10 Sekretion in den Kulturüberstand detektiert werden. Für unmodifizierte und Cas9-exprimierende

NK-92/5.28.z Zellen, welche ohne Tumorzellen kultiviert wurden, wurde eine IL-10 Konzentration von 1,09 ng/ml und 1,02 ng/ml im Überstand gemessen. Nach Ko-Inkubation mit den Zielzellen MDA-MB453 stieg diese auf bis zu 10,9 ng/ml (NK-92/5.28.z) bzw. 12,5 ng/ml (NK-92/5.28.z/Cas9) an. Bei IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen wurde dagegen im nicht aktivierten und aktivierten Zustand keine IL-10 Sekretion detektiert. Damit wurde der vollständige Verlust der IL-10 Expression in den ausgewählten IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierenden parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellklonen bestätigt.

4.3.3 Hemmung der IL-10 Sekretion durch intrazelluläre Expression

IL-10-neutralisierender scFv-Antikörper

Um die Freisetzung und Aktivität von IL-10 nicht nur auf mRNA- und DNA-Ebene, sondern auch direkt auf Protein-Ebene zu hemmen, wurden rekombinante anti-IL-10 Antikörper zur intrazellulären Expression in NK-92 Zellen entworfen (Intrabodies) (Abb. 4.10). Zum einen wurde ein Antikörpermolekül konstruiert, das in den extrazellulären Raum sekretiert wird (α IL-10S), um dort die IL-10 Aktivität zu blockieren. Zum anderen umfasste der Ansatz Antikörper, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind (α IL-10TM) oder die Sekretion von IL-10 verhindern, indem der Transport des Zytokins aus der Zelle unterbunden wird (α IL-10ER). Der Antikörper α IL-10S enthält am N-Terminus ein Signalpeptid der schweren Kette eines IgG-Antikörpers, gefolgt von einem scFv-Antikörperfragment, zusammengesetzt aus den variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) des IL-10-spezifischen Antikörpers BT-063. Diese beiden Domänen sind über einen $(G_4S_3)_3$ -Linker miteinander verbunden (siehe 4.2.1). Dem schließt sich die Peptid-Sequenz des HA-Tags, abgeleitet vom Hämagglutinin Glykoprotein des humanen Influenzavirus, zur immunologischen Detektion des Antikörpers an. Der scFv-Antikörper α IL-10ER trägt zusätzlich am C-Terminus eine KDEL-Sequenz, wodurch das Molekül im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) zurückgehalten werden soll (Beerli et al., 1994b). Um den Antikörper α IL-10TM in der Zellmembran von NK-92 Zellen zu verankern, wurde an die Sequenz von α IL-10S am C-Terminus eine flexible Gelenkregion (*hinge*) der humanen CD8 α -Kette und die Transmembrandomäne des humanen CD28 Moleküls (CD28TM) angefügt. Die beschriebenen Antikörpersequenzen wurden in den lentiviralen Transfervektor pHR'SIN-cPPT-SIEW (pSIEW) unter der Kontrolle des SFFV-Promotors eingefügt. Der Vektor kodiert weiterhin das Markerprotein EGFP, welches mit den Antikörpersequenzen über eine IRES-Sequenz verknüpft ist.

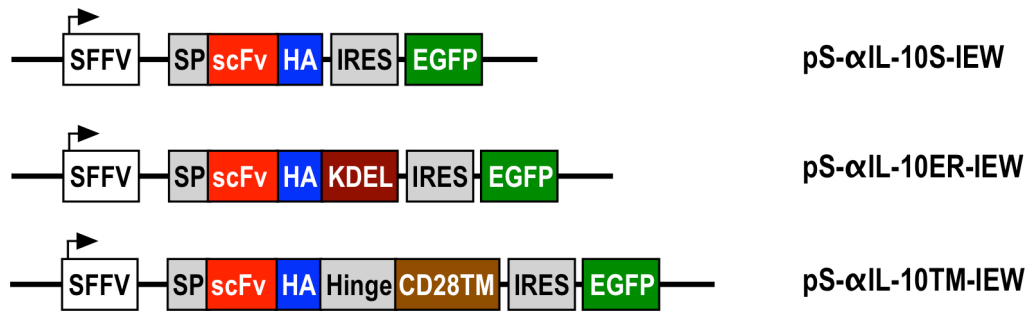


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Konstrukte zur Expression von anti-IL-10 scFv-Antikörpern. Gezeigt sind die lentiviralen Vektoren S-αIL-10S-IEW, S-αIL-10ER-IEW, S-αIL-10TM-IEW für die intrazelluläre Expression der konstruierten anti-IL-10 scFv-Antikörper. αIL-10S wird unter der Kontrolle des SFFV-Promotors exprimiert, dem ein Signalpeptid (SP) der schweren Kette eines IgG-Antikörpers folgt. Es schließt sich das scFv-Antikörperfragment an, bestehend aus den variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) des IL-10-spezifischen Antikörpers BT-063, die über einen $(G_4S_3)_3$ -Linker miteinander verknüpft sind (scFv). Dem folgt die Sequenz für den HA-Tag. Durch das Anfügen einer KDEL-Sequenz am C-Terminus wurde der Antikörper αIL-10ER generiert. Um den anti-IL-10 Antikörper in der Zellmembran zu verankern, wurden C-terminal die kodierenden Sequenzen für die flexible Gelenkregion der humanen CD8α-Kette (*hinge*) und die Transmembrandomäne des humanen CD28 Moleküls (CD28TM) angefügt (αIL-10TM). Über eine IRES-Sequenz wurde das EGFP Markerprotein in allen Konstrukten ko-exprimiert.

Mit Hilfe von HEK293T Zellen wurden VSV-G pseudotypisierte lentivirale Vektorpartikel hergestellt und für die Transduktion von parentalen NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen im Beisein von Polybren und dem Multi-Kinase-Inhibitor BX795 genutzt. Aufgrund der geringen Transduktionseffizienz (Daten nicht gezeigt) wurden erfolgreich transduzierte NK-92 Zellen anhand ihrer EGFP-Expression durchflusszytometrisch an einem FACSaria Zellsortierer angereichert und anschließend expandiert. Daraufhin wurden Zelllysate und Zellkulturüberstände der erhaltenen Zellpopulationen mittels Immunoblot mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper auf die Expression und Sekretion der anti-IL-10 scFv-Antikörper hin überprüft (Abb. 4.11). Es zeigte sich, dass die Antikörper αIL-10S und αIL-10ER in den transduzierten parentalen NK-92 Zellen (Abb. 4.11 A) und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen (Abb. 4.11 B) sowohl im Zelllysate als auch im Überstand als Proteine mit der erwarteten molekularen Masse von 27 kDa nachweisbar waren. Dabei wurde in den Lysaten eine deutlich höhere Protein-Menge des im ER exprimierten scFv-Antikörpers (αIL-10ER) detektiert als des sekretierten Antikörper-Konstrukts (αIL-10S). Entsprechende Daten wurden mit den analysierten Überständen erhalten.

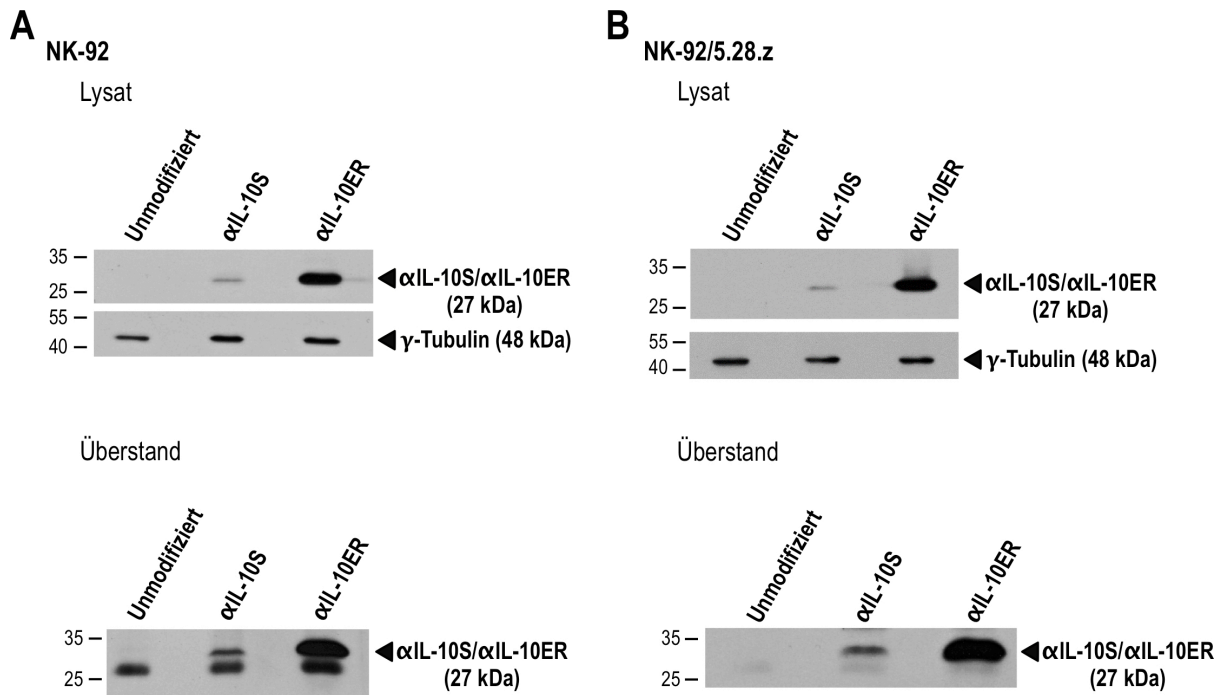


Abb. 4.11: Expression der αIL-10S und αIL-10ER Antikörper in transduzierten NK-92 Zellen. Mittels Immunoblot wurde die Expression der scFv-Antikörper αIL-10S und αIL-10ER in den Zelllysaten (oben) und die Sekretion in die Zellkulturüberstände (unten) von parentalen (A) und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen (B) untersucht. Dazu wurden 30 µg Gesamt-Protein oder 40 µl des Zellkulturüberstandes in einem 12,5%igen PAA-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die αIL-10S und αIL-10ER Antikörper mit einem anti-HA-Tag Antikörper detektiert. Für die Analyse der Zelllysate wurde γ-Tubulin als Ladekontrolle mitgeführt. Zum Vergleich ist die Position ausgewählter Proteinstandards mit der jeweiligen molekularen Masse in kDa eingezeichnet.

Der in der Zellmembran verankerte Antikörper αIL-10TM konnte in der Immunoblot-Analyse mit dem HA-Tag-spezifischen Antikörper nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde in diesem Fall für die Untersuchung des Zelllysats und des Zellkulturüberstands mittels Immunoblot ein gegen die Gelenkregion des humanen CD8α gerichteter Antikörper eingesetzt (Abb. 4.12). Für durchflusszytometrische Analysen wurde dagegen ein HA-Tag-spezifischer Antikörper genutzt (Abb. 4.13). Im Immunoblot wurde die Zelllinie K562/IL-10TM als Positiv-Kontrolle verwendet, die membranständiges IL-10 auf der Oberfläche exprimiert, das ebenfalls die Gelenkregion des humanen CD8α enthält. Sowohl im Fall der mit dem αIL-10TM-Konstrukt transduzierten parentalen (Abb. 4.12 A) als auch der CAR-exprimierenden NK-92 Zellen (Abb. 4.12 B) konnte in den Lysaten die Expression des αIL-10TM Antikörpers als Bande bei 37 kDa detektiert werden. Den Erwartungen entsprechend wurde keine Sekretion des membranständigen scFv-Antikörpers in den Überständen beobachtet.

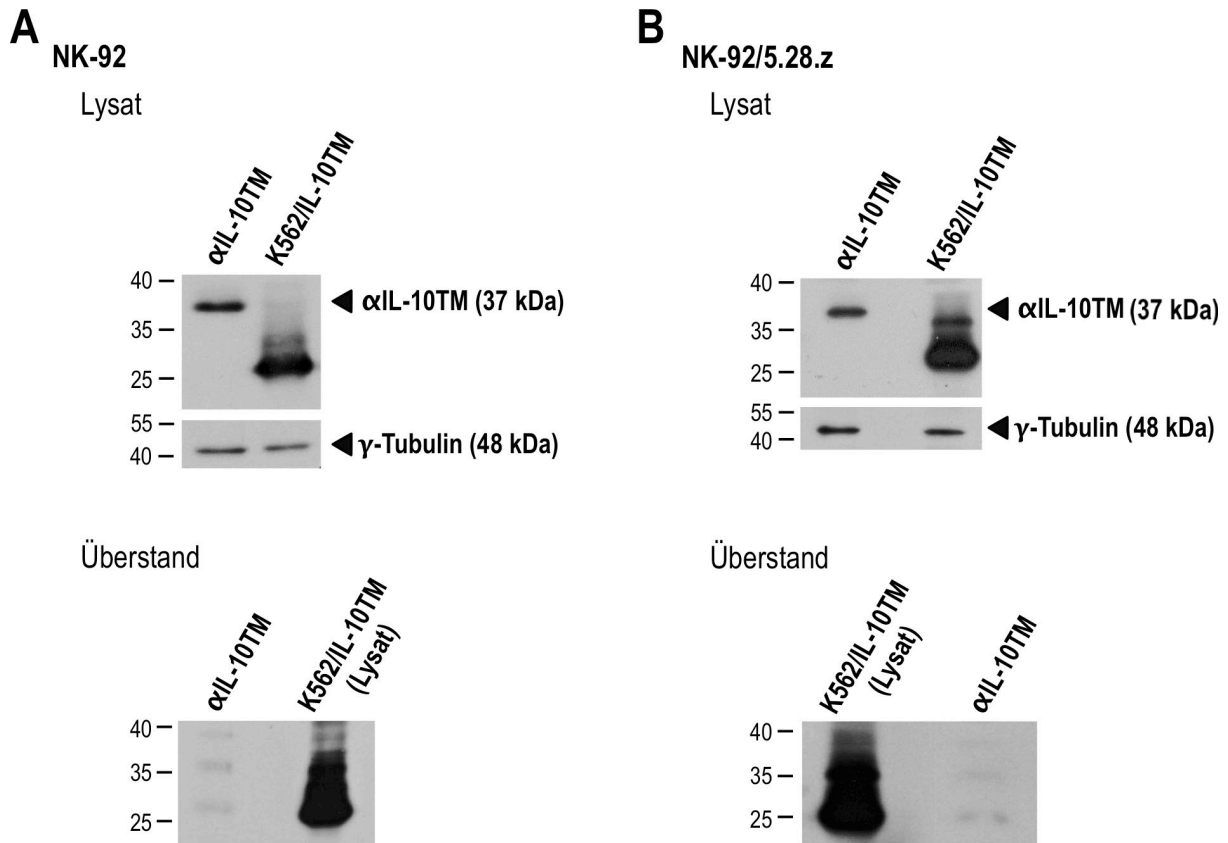


Abb. 4.12: Expression des αIL-10TM Antikörpers in transduzierten NK-92 Zellen. Mittels Immunoblot wurde die Expression des scFv-Antikörpers αIL-10TM in den Zelllysaten (oben) und die Sekretion in die Zellkulturüberstände (unten) von parentalen **(A)** und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen **(B)** untersucht. Dazu wurden 30 µg Gesamt-Protein oder 40 µl des Zellkulturüberstandes in einem 12,5%igen PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit einem anti-CD8α Antikörper. Als Positiv-Kontrolle wurde Lysat von K562/IL-10TM Zellen mitgeführt. γ-Tubulin wurde als Ladekontrolle zur Analyse der Zelllysate detektiert. Zum Vergleich ist die Position ausgewählter Proteinstandards mit der jeweiligen molekularen Masse in kDa eingezeichnet.

Die erfolgreiche Expression von αIL-10TM auf der Oberfläche der NK-Zellen wurde in FACS-Experimenten bestätigt, in denen spezifische Signale für S-αIL-10TM-IEW-transduzierte NK-92 Zellen mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper erhalten wurden. Dagegen wurde mit unmodifizierten NK-Zellen kein Signal beobachtet (Abb. 4.13).

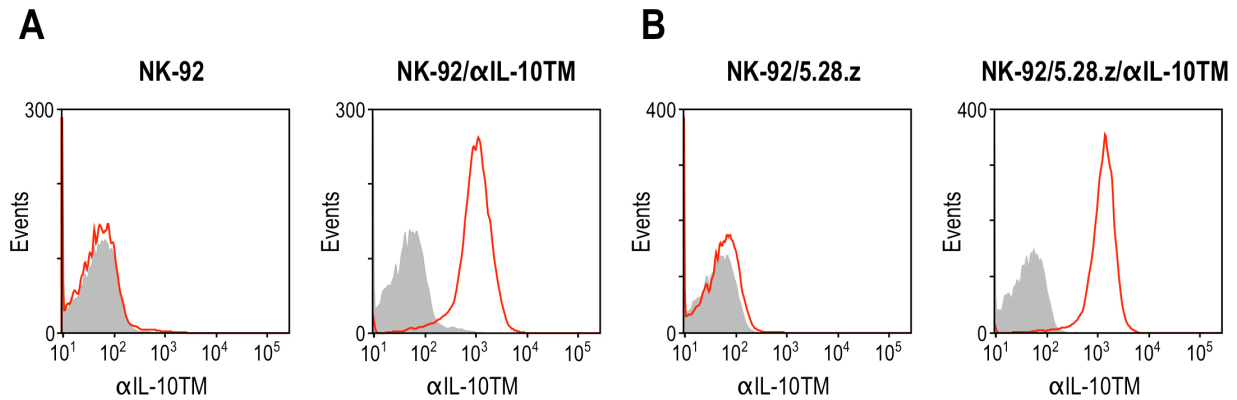


Abb. 4.13: Oberflächenexpression des Antikörpers αIL-10TM auf parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen. Die Oberflächenexpression wurde durch die Färbung mit einem anti-HA-Tag Primärantikörper gefolgt von einem anti-Maus-AF647 Sekundärantikörper untersucht (rote Linie). NK-92 Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden, dienten als Kontrolle (graue Fläche).

Der Umstand, dass der αIL-10ER Antikörper als Fremdprotein im ER-Lumen zurückgehalten wird, könnte zum *unfolded protein response* (UPR) führen, welcher die Hemmung der globalen Proteinsynthese und eine gesteigerte Expression von ER-spezifischen Stressgenen mit sich bringt (Kaufman, 1999). Dies kann langfristig in einer Fehlfunktion der Zelle resultieren und deren Zelltod begünstigen. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst αIL-10ER-exprimierende parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen in eine 6-well Kulturplatte ausgesät. Unmodifizierte und αIL-10S-exprimierende NK-92 Zellen wurden als Kontrollansätze mitgeführt. Weiterhin wurden NK-92 Zellen mit Thapsigargin (in DMSO gelöst, Endkonzentration: 0,5 μM) behandelt. Thapsigargin ist ein zellgängiges Lacton, das die Ca²⁺-ATPase im sarko/endoplasmatischen Retikulum (SERCA) hemmt und damit zu einer Reduktion der Ca²⁺-Konzentration im ER führt (Oslowski and Urano, 2011). Dies wiederum resultiert in einem Verlust der Aktivität Ca²⁺-abhängiger Chaperone und führt damit zur Akkumulation ungefalteter Proteine, was eine ER-Funktionsstörung und den UPR auslöst. Somit diente die Behandlung der NK-Zellen mit Thapsigargin als Positiv-Kontrolle für eine induzierte ER-Stressantwort. Die NK-92 Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden Zelllysate hergestellt, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot auf die Expression der Proteine BiP, eIF2α und p-eIF2α hin mit spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 4.14). Bei BiP (*immunoglobulin heavy-chain-binding protein*, auch GRP78 genannt) handelt es sich um ein HSP (Hitzeschockprotein) 70, welches für die korrekte Faltung und Assemblierung der Proteine im ER zuständig ist (Gething, 1999). Es wird konstitutiv produziert, jedoch führt der UPR zu einer erhöhten Expression des Proteins (Kozutsumi et al., 1988). Die Ansammlung ungefalteter Proteine im ER resultiert u.a. auch in der Aktivierung der in der ER-Membran verankerten Protein-Kinase PERK, welche die α-Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2-alpha (eIF2α) phosphoryliert (p-eIF2α)

und so eine globale Hemmung der Proteinsynthese einleitet (Harding et al., 2000). Daher standen im Fokus der Untersuchungen die Proteine BiP und p ϵ lF2 α .

Sowohl für parentale (Abb. 4.14 A), als auch für ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen (Abb. 4.14 B) wurde die konstitutive Expression des Chaperons BiP bei 78 kDa nachgewiesen. Dabei unterschied sich die Protein-Menge in unmodifizierten NK-Zellen nicht von der in α IL-10S- und α IL-10ER-exprimierenden NK-92 Zellen. Im Vergleich dazu wurde in Thapsigargin-behandelten Zellen das Protein verstärkt exprimiert. Weiterhin führte die Behandlung von NK-92 Zellen mit Thapsigargin zur Phosphorylierung des Proteins eIF2 α (38 kDa). Dies wurde jedoch nicht in unmodifizierten, α IL-10S- oder α IL-10ER-exprimierenden parentalen und CAR NK-92 Zellen beobachtet. Dagegen wurde in allen analysierten Proben die gleiche Menge an eIF2 α Gesamt-Protein detektiert. Diese Daten legen nahe, dass auch die Expression von α IL-10TM in NK-92 Zellen keinen UPR auslöst.

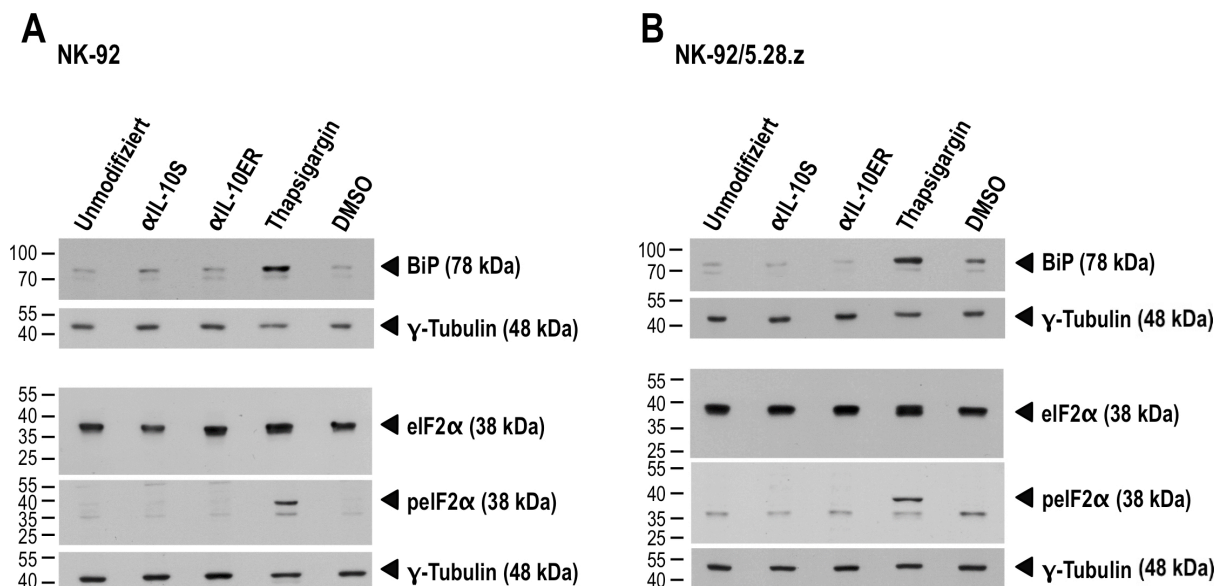


Abb. 4.14: Auswirkung der α IL-10ER-Expression in parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen auf die Expression ER-spezifischer Stressproteine. 2×10^6 α IL-10ER-exprimierende parentale (A) und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen (B) wurden in 3 ml X-VIVO⁺⁺ Medium in eine 6-well Kulturplatte ausgesät. Weiterhin wurden unmodifizierte und α IL-10S-exprimierende NK-92 Zellen mitgeführt. Um eine ER-Stressantwort zu induzieren, wurden NK-Zellen mit 0,5 μ M Thapsigargin (in DMSO gelöst) für 12 h - 14 h behandelt. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt. 30 μ g Gesamt-Protein wurden in einem 7,5%igen oder 10%igen PAA-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und auf die Expression der Proteine BiP und eIF2 α , sowie p ϵ lF2 α hin mit spezifischen Antikörpern untersucht. Als Ladekontrolle wurde γ -Tubulin nachgewiesen. Zum Vergleich ist die Position ausgewählter Proteinstandards mit der jeweiligen molekularen Masse in kDa eingezeichnet.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der scFv-Antikörper-Expression in NK-92 Zellen auf deren IL-10 Sekretion bestimmt (Abb. 4.15). Dazu wurden die NK-92 Zellen mit Tumorzellen ko-inkubiert und die Zellkulturüberstände mittels eines *Cytometric Bead Array* auf das Vorhandensein von IL-10 hin analysiert.

Im nicht aktivierten Zustand sezernierten parentale NK-92 Zellen ca. 0,13 ng/ml IL-10 in den Zellkulturüberstand (Abb. 4.15 A). Diese Konzentration war auf 0,05 ng/ml bei α IL-10S-, auf 0,01 ng/ml bei α IL-10ER- und auf 0,03 ng/ml bei α IL-10TM-exprimierenden, parentalen NK-92 Zellen signifikant reduziert. Nach Aktivierung der unmodifizierten NK-Zellen mit der Tumorzelllinie K562 erhöhte sich die IL-10 Konzentration im Überstand auf 1,90 ng/ml. Aktivierte α IL-10S- und α IL-10TM-exprimierende NK-92 Zellen sekretierten dagegen um 57% (α IL-10S) bzw. 88% (α IL-10TM) reduzierte IL-10 Mengen von 0,80 ng/ml und 0,22 ng/ml. Interessanterweise konnte die IL-10 Ausschüttung durch die Expression des α IL-10ER-Antikörpers in aktivierten NK-92 Zellen sogar auf 0,07 ng/ml und damit um 96% reduziert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden für CAR-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen erhalten (Abb. 4.15 B). Dabei zeigte sich, wie zuvor beobachtet (Abb. 4.7, 4.9), dass nicht aktivierte und aktivierte NK-92/5.28.z Zellen deutlich mehr IL-10 in den Zellkulturüberstand sekretierten als parentale NK-92 Zellen. So wurde im nicht aktivierten Zustand eine IL-10 Konzentration von ca. 0,62 ng/ml gemessen. Diese war auf 0,41 ng/ml bei α IL-10S-, auf 0,05 ng/ml bei α IL-10ER-, und auf 0,11 ng/ml bei α IL-10TM-exprimierenden CAR NK-92 Zellen reduziert. Durch eine sechsstündige Aktivierung der unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen mit der ErbB2-exprimierenden Tumorzelllinie MDA-MB453 erhöhte sich die IL-10 Konzentration auf 16,2 ng/ml. Bei Expression des α IL-10S Antikörpers in NK-92/5.28.z Zellen war die IL-10 Ausschüttung um 15% reduziert (13,8 ng/ml). Bei α IL-10TM-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen wurde nach Tumorzell-Stimulierung eine um 82% verminderte IL-10 Konzentration (2,94 ng/ml) gemessen. Bei aktivierten α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen war ähnlich wie bei den entsprechenden parentalen NK-92 Zellen die IL-10 Sekretion auf 0,39 ng/ml und damit um 97% reduziert.

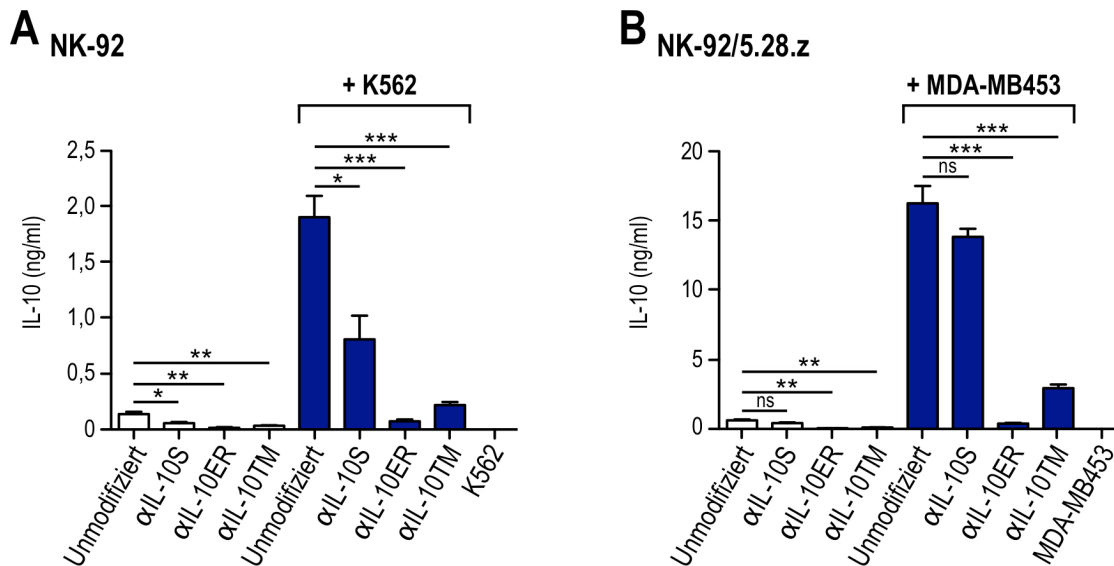


Abb. 4.15: Hemmung der IL-10 Produktion in NK-92 Zellen durch die intrazelluläre Expression IL-10-spezifischer scFv-Antikörper. Unmodifizierte und mit anti-IL-10 Antikörperkonstrukten transduzierte parentale (A) oder ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen (B) wurden im Verhältnis von 1:1 mit den Tumorzelllinien K562 oder MDA-MB453 für 6 h ko-inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und mittels *Cytometric Bead Array* auf die IL-10 Konzentration hin untersucht. Die Werte der X-VIVO⁺⁺ Mediumkontrolle wurden von den dargestellten Werten subtrahiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant.

4.3.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.3.1 bis 4.3.3

Unterschiedliche Ansätze zur Hemmung der IL-10 Produktion in NK-92 Zellen wurden untersucht. Diese umfassten die Einbringung einer IL-10-spezifischen shRNA, einen IL-10 Gen-*knockout* mittels CRISPR/Cas9 und die intrazelluläre Expression IL-10-spezifischer scFv-Antikörper. Die verfolgten Strategien zeigten sich alle in NK-92 Zellen erfolgreich, führten jedoch zu einer im Ausmaß unterschiedlichen Reduktion der IL-10 Expression. Das Einbringen der spezifischen shRNA führte zu einer ca. 60%igen Reduktion der IL-10 Sekretion nach Aktivierung der NK-92 Zellen mit Tumorzellen. Der Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems in parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen induzierte einen vollständigen *knockout* des IL-10 Gens. Wurde der αIL-10S-Antikörper in parentalen NK-92 oder NK-92/5.28.z Zellen exprimiert, reduzierte dies ihre IL-10 Sekretion nach Ko-Inkubation mit Tumorzellen um 57% (parentale NK-92) bzw. 15% (NK-92/5.28.z). Hingegen führte die Expression des αIL-10TM-Antikörpers in aktivierten parentalen NK-92 Zellen zu einer 88%igen und in NK-92/5.28.z Zellen zu einer 82%igen Reduktion der IL-10 Sekretion. Neben dem kompletten Gen-*knockout* wurde die IL-10 Ausschüttung in NK-92 Zellen am effizientesten durch die Expression des αIL-10ER Antikörpers reduziert (um bis zu 97%). Zudem wurde gezeigt, dass die Expression der αIL-10ER- und αIL-10S-Antikörper in parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen keinen *unfolded protein response* auslöste.

4.4 Einfluss der IL-10 Depletion auf die Funktionalität von NK-92 Zellen *in vitro*

Wie in den vorherigen Abschnitten dargestellt, konnte in NK-92 Zellen mittels shRNA, Gen-Editierung und intrazellulärer Antikörper-Expression eine Verminderung oder vollständige Eliminierung der IL-10 Expression oder eine Hemmung der IL-10 Sekretion erreicht werden. Im Anschluss daran wurde untersucht, ob dies einen Einfluss auf das Wachstum, die natürliche und CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine von NK-92 Zellen ausübt.

4.4.1 Lebensfähigkeit und Wachstum von NK-92 Zellen mit blockierter IL-10 Expression oder Sekretion

Um den Einfluss einer verminderten oder vollständigen Eliminierung der IL-10 Expression auf die Lebensfähigkeit und das Wachstum von NK-92 Zellen zu bestimmen, wurde die Lebend-Zellzahl über einen Zeitraum von sieben Tagen über eine Trypanblau-Färbung bestimmt. NK-92 Zellen mit unbeeinflusster IL-10 Expression wurden als Kontrolle mitgeführt (Abb. 4.16). Es zeigte sich, dass NK-92/Ctrl-shRNA Zellen ein ähnliches Wachstumsverhalten aufwiesen wie unmodifizierte parentale NK-92 Zellen (Abb. 4.16 A). So umfasste die Zellzahl an Tag 7 durchschnittlich $18,1 \times 10^5$ Zellen/ml für unmodifizierte und $17,7 \times 10^5$ Zellen/ml für Ctrl-shRNA-exprimierende NK-92 Zellen. Auch NK-92 Zellen mit reduzierter Expression der IL-10 mRNA (NK-92/IL-10-shRNA) zeigten eine ähnliche Proliferationsrate wie die mitgeführten Kontrollansätze. Ähnliches wurde für NK-92 Zellen beobachtet, die mittels CRISPR/Cas9 Gen-editiert waren. Zwar ist anzumerken, dass sich die durchschnittliche Zellzahl der nur Cas9 exprimierenden NK-92 Kontrollzellen an Tag 5 mit $15,2 \times 10^5$ Zellen/ml deutlich von der am gleichen Tag gemessenen Zellzahl von $9,4 \times 10^5$ Zellen/ml für unmodifizierte NK-92 Zellen unterschied, unabhängig davon wiesen jedoch beide Zelllinien über den beobachteten Zeitraum ein vergleichbares Wachstumsverhalten auf. Die vollständige Eliminierung der IL-10 Expression auf DNA-Ebene hatte im Vergleich zu parental NK-92 Zellen keine signifikanten Auswirkungen auf die Proliferation, obgleich auch hier an Tag 5 mit einer gemessenen Zellzahl von $10,7 \times 10^5$ Zellen/ml eine Abweichung im Vergleich zu NK-92/Cas9 Kontrollzellen vorlag. Im Fall der intrazellulären Expression von scFv-Antikörpern wurde kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten der α IL-10S- und α IL-10ER-exprimierenden NK-92 Zellen untereinander und im Vergleich zu unmodifizierten parental NK-92 Zellen festgestellt. So wurde an Tag 7 eine Zellzahl von $18,0 \times 10^5$ Zellen/ml für unmodifizierte NK-92 Zellen ermittelt, die sich nur unwesentlich von $19,0 \times 10^5$ Zellen/ml für NK-92/ α IL-10S und $19,9 \times 10^5$ Zellen/ml für NK-92/ α IL-10ER unterschied. Auffällig war dagegen das Wachstumsverhalten der α IL-10TM-exprimierenden NK-92 Zellen. Diese proliferierten etwas langsamer als unmodifizierte NK-92 Zellen, was sich in der gemessenen Zellzahl von nur $13,6 \times 10^5$ Zellen/ml

an Tag 7 widerspiegelte. Insgesamt weisen diese Daten jedoch darauf hin, dass die Reduktion oder vollständige Eliminierung der IL-10 Expression keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum von NK-92 Zellen ausübt. Um zu überprüfen, ob dies auch bei ErbB2-spezifischen CAR-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen der Fall ist, wurden hier ebenfalls Lebensfähigkeit und Proliferationsrate bestimmt (Abb. 4.16 B). Dabei zeigte sich, dass sich unmodifizierte und Ctrl-shRNA-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen im Wachstumsverhalten signifikant unterschieden. So wurde eine um 42% geringere Zellzahl von $12,0 \times 10^5$ Zellen/ml für NK-92/5.28.z/Ctrl-shRNA an Tag 7 im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen gemessen, für welche eine Zellzahl von $20,6 \times 10^5$ Zellen/ml ermittelt wurde. NK-92/5.28.z/IL-10-shRNA Zellen mit reduzierter IL-10 mRNA Expression ähnelten in ihrer Proliferation jedoch unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen, was sich in der gemessenen Zellzahl von $19,2 \times 10^5$ Zellen/ml an Tag 7 zeigte. Dies deutet auf einen unerwarteten Effekt der Ctrl-shRNA auf die Proliferation von NK-92/5.28.z Zellen hin. Der Einsatz des CRISPR/Cas9 Systems in NK-92/5.28.z führte zu keinem Unterschied in der Proliferation im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen. Dies zeigte sich in der annähernd gleichen Zellzahl von $21,6 \times 10^5$ Zellen/ml für unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen, $20,2 \times 10^5$ Zellen/ml für Cas9-exprimierende und $22,4 \times 10^5$ Zellen/ml für IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen an Tag 7. Die Proliferation blieb auch bei intrazellulärer Expression der scFv-Antikörper α IL-10S und α IL-10ER unbeeinflusst. Zwar waren die an Tag 7 festgestellten Zellzahlen von $18,4 \times 10^5$ Zellen/ml für NK-92/5.28.z/ α IL-10S und $19,9 \times 10^5$ Zellen/ml für NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen etwas geringer als die unmodifizierter NK-92/5.28.z Zellen von $22,2 \times 10^5$ Zellen/ml, diese Unterschiede waren jedoch nur unwesentlich. Anders verhielt es sich mit dem Wachstum von α IL-10TM-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen. Wie auch schon für parentale NK-92 Zellen beobachtet, proliferierten NK-92/5.28.z/ α IL-10TM langsamer als die unmodifizierten Zellen. So wurden nach sieben Tagen nur $15,5 \times 10^5$ NK-92/5.28.z/ α IL-10TM Zellen/ml gezählt. Allerdings waren diese Unterschiede zu den Werten der anderen NK-92/5.28.z Varianten statistisch nicht signifikant. Insgesamt konnte so auch für NK-92/5.28.z Zellen gezeigt werden, dass die Hemmung der IL-10 Expression und Sekretion das Wachstumsverhalten dieser Zellen nicht beeinträchtigt. Damit kann eine Abhängigkeit von endogen produziertem IL-10 für die Lebensfähigkeit und Proliferation von NK-92 Zellen ausgeschlossen werden.

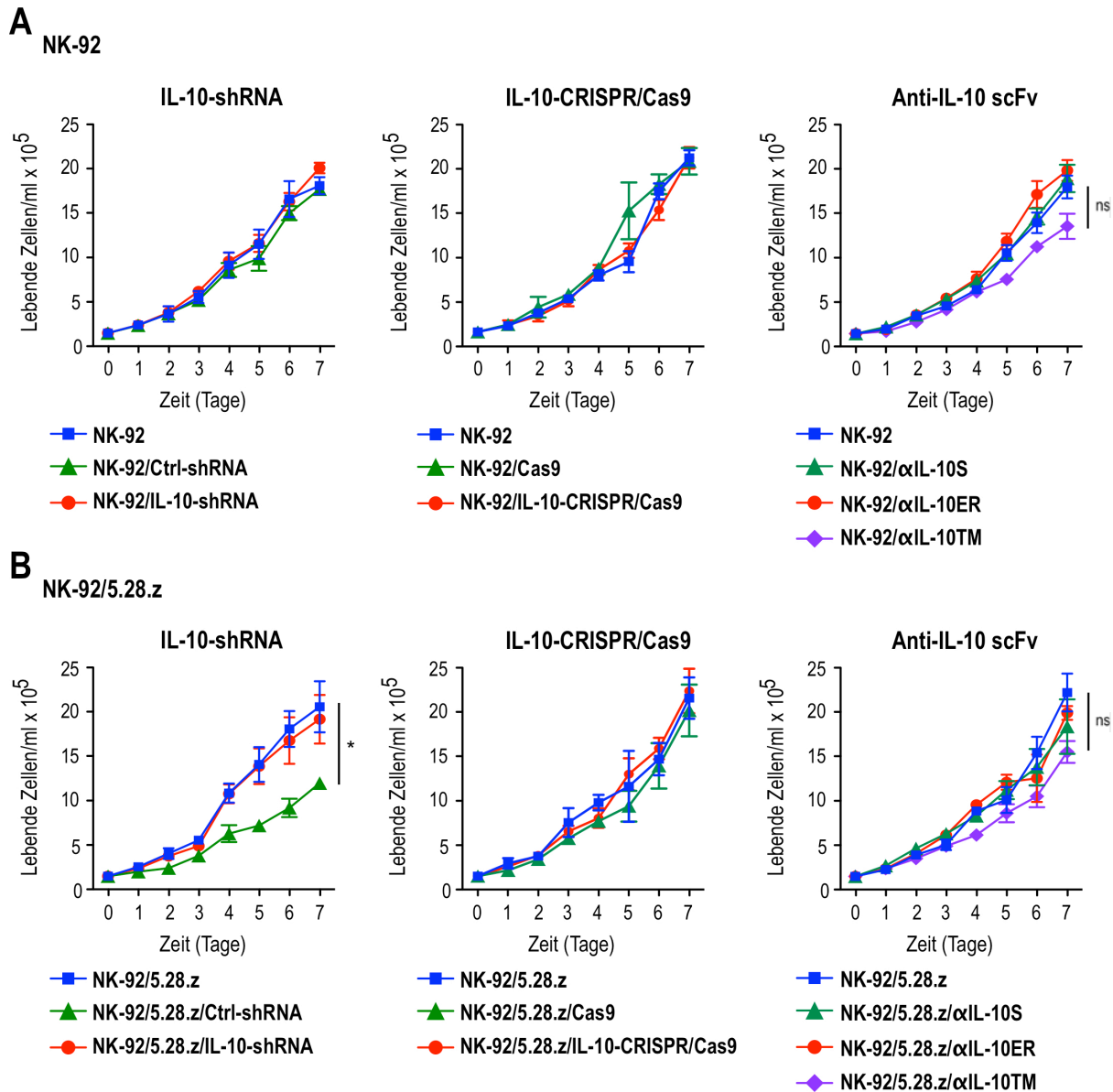


Abb. 4.16: Wachstum parentaler und CAR-exprimierender NK-92 Zellen nach IL-10 Depletion. Unter Einsatz einer IL-10-spezifischen shRNA (links), eines CRISPR/Cas9-vermittelten Gen-*knockouts* (Mitte) und der intrazellulären Expression von scFv-Antikörpern (rechts) wurde untersucht, ob die Hemmung der Expression und Sekretion von IL-10 die Lebensfähigkeit und das Wachstum parentaler **(A)** und ErbB2-spezifischer CAR NK-92 Zellen **(B)** beeinflusst. Dazu wurden zu Beginn $1,5 \times 10^5$ unmodifizierte oder bezüglich IL-10 Expression manipulierte NK-92 Zellen in 1 ml X-VIVO⁺⁺ Medium in eine 24-well Kulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden jeden Tag für einen Zeitraum von sieben Tagen gezählt, wobei der Ausschluss toter Zellen über die Färbung mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung erfolgte. Für jede der verwendeten *knockdown/knockout* Strategien sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. *: $p < 0,5$; ns: nicht signifikant.

4.4.2 Natürliche und CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität

IL-10-depletierter NK-92 Zellen

Neben dem Effekt auf Lebensfähigkeit und Wachstum war vor allem die Anti-Tumor-Aktivität IL-10-depletierter NK-92 Zellen von Interesse, da in der Literatur beschrieben ist, dass IL-10 eine stimulierende Wirkung auf die *in vitro* Zytotoxizität von NK-Zellen haben kann (Mocellin et al., 2003; Schulz et al., 2010). In ihrer IL-10 Expression und Sekretion modifizierte NK-92 Zellen wurden auf ihre natürliche und NK-92/5.28.z Zellen zusätzlich auf ihre CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität hin untersucht und mit unmodifizierten NK-92 Zellen verglichen. Für die Untersuchung der NK-Zell-vermittelten Tumorzelllyse wurden K562 oder MDA-MB453 und MDA-MB468 Tumorzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein Violet (CV) angefärbt und anschließend mit NK-Zellen in unterschiedlichen Effektor- zu Zielzell (*Target*, E/T)-Verhältnissen gemischt. Nach zweistündiger Ko-Inkubation wurden tote Zellen in der Ko-Kultur mit einer PI-Lösung gefärbt. Die Zellen wurden sodann an einem FACSCanto II Durchflusszytometer gemessen, um den Anteil lysierter und damit CV und PI doppelt positiver Zielzellen zu ermitteln.

Für die Analyse der natürlichen Zytotoxizität wurde die Standard-Zielzelllinie K562 gewählt (Abb. 4.17). K562 Zellen wurden von unmodifizierten und shRNA-exprimierenden NK-92 Zellen lysiert, allerdings ergaben sich Unterschiede im Ausmaß der Abtötung (Abb. 4.17 A). So wurden K562 Zellen bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 durchschnittlich zu $59,4\% \pm 5,1\%$ von unmodifizierten NK-92 Zellen lysiert. NK-92/Ctrl-shRNA Zellen lysierten die Tumorzellen im gleichen E/T-Verhältnis mit $43,5\% \pm 2,5\%$ dagegen deutlich schlechter. Dies zeigte sich auch bei einem E/T-Verhältnis von 5:1, allerdings waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Bei einem Verhältnis von 1:1 lag nur ein unwesentlicher Unterschied in der Zytotoxizität unmodifizierter und Ctrl-shRNA-exprimierender NK-92 Zellen gegenüber den Zielzellen vor. Daraus ist zu folgern, dass die Ctrl-shRNA die Funktionalität parentaler NK-92 Zellen beeinflusst. NK-92/IL-10-shRNA Zellen mit einer reduzierten Expression der IL-10 mRNA töteten K562 Zellen in den untersuchten E/T-Verhältnissen jedoch in einem ähnlichen Ausmaß ab wie unmodifizierte NK-92 Zellen. Im 2 h Zytotoxizitätsassay erwiesen sich K562 Zellen auch sensitiv gegenüber Cas9- und IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierenden NK-92 Zellen. Hierbei war kein signifikanter Unterschied in der Lyse der Zielzellen durch unmodifizierte NK-92 Zellen und NK-92/Cas9 Zellen festzustellen. So betrug bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 der Anteil lysierter K562 Zellen im Fall der unmodifizierten NK-92 Zellen im Durchschnitt $59,1\% \pm 2,0\%$ und $58,1\% \pm 1,2\%$ für Cas9-exprimierende NK-Zellen. NK-92 Zellen mit einem vollständigen IL-10 Gen-*knockout* töteten die Tumorzellen bei gleichem E/T-Verhältnis mit einer ähnlichen Effizienz von $57,3\% \pm 1,4\%$ ab. Auch die intrazelluläre Expression der scFv-Antikörper α IL-10S und α IL-10ER beeinflusste die Zytotoxizität der parentalen NK-92 Zellen nicht. So wurden in diesem Experiment K562 Zellen bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 von

unmodifizierten Zellen zu $60,0\% \pm 2,0\%$, von NK-92/ α IL-10S Zellen zu $63,4\% \pm 2,1\%$ und von NK-92/ α IL-10ER Zellen zu $60,6\% \pm 1,5\%$ abgetötet. Aus diesen Daten ist zu schließen, dass eine IL-10 Depletion in NK-92 Zellen die natürliche Zytotoxizität nicht beeinflusst. Hingegen war auffällig, dass die Tumorzellen bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 von α IL-10TM-exprimierenden NK-92 Zellen nur zu $46,9\% \pm 2,7\%$ und damit signifikant schlechter als von unmodifizierten NK-92 Zellen lysiert wurden. Vergleichbare Daten wurden bei einem E/T-Verhältnis von 5:1 erhalten, obgleich die Unterschiede hier statistisch nicht signifikant waren. Bei einem Einsatz der NK-92/ α IL-10TM Zellen in einem E/T-Verhältnis von 1:1 war die Lyse mit $21,1\% \pm 2,3\%$ jedoch vergleichbar mit der von α IL-10S ($23,3\% \pm 0,3\%$)- und α IL-10ER ($20,7\% \pm 1,62\%$)-exprimierenden NK-92 Zellen. Diese Daten zeigen, dass sich die Expression des α IL-10TM-Antikörpers in parentalen NK-92 Zellen nicht nur nachteilig auf die Proliferation, sondern auch auf die natürliche Zytotoxizität der Zellen auswirkt.

Unmodifizierte und IL-10-depletierte NK-92/5.28.z Zellen waren ebenfalls in der Lage, K562 Tumorzellen abzutöten (Abb. 4.17 B). Dabei zeigte sich kein Einfluss der Expression der Ctrl-shRNA oder der IL-10-spezifischen shRNA auf das Abtöten der Zielzellen im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28 Zellen. So betrug der Anteil durch unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen lysierter K562 Zellen bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 ca. $48,5\% \pm 0,7\%$, bei NK-92/5.28.z/Ctrl-shRNA Zellen $47\% \pm 3,4\%$ und bei NK-92/5.28.z/IL-10-shRNA Zellen $48,8\% \pm 2,2\%$. Auch ein kompletter *knockout* des IL-10 Gens durch den Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems führte zu keiner Veränderung in der Zytotoxizität der ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen gegenüber K562 Zellen. Die Zielzellen wurden bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 von NK-92/5.28.z/IL-10-CRISPR/Cas9 Zellen zu $68,2\% \pm 5,7\%$ lysiert, wobei kein signifikanter Unterschied zu der Lyse durch unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen von $69,7\% \pm 4,9\%$ und durch NK-92/5.28.z/Cas9 Zellen von $75,8\% \pm 6,0\%$ festzustellen war. ScFv-Antikörper-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen töteten K562 Zellen ebenfalls ab. Bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 wurden K562 Zellen durch unmodifizierte ($59,7\% \pm 0,9\%$), α IL-10S ($54,3\% \pm 3,7\%$)- und α IL-10ER ($61,5\% \pm 3,2\%$)-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen effizient lysiert. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Reduktion oder vollständige Eliminierung der IL-10 Expression an sich die natürliche Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen nicht beeinträchtigt. Hingegen wurde wie bereits in parentalen NK-92 Zellen die natürliche Zytotoxizität durch die Expression des α IL-10TM-Antikörpers in NK-92/5.28.z Zellen nachteilig beeinflusst. So töteten NK-92/5.28.z/ α IL-10TM Zellen die Zielzellen bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 nur zu $21\% \pm 1,9\%$ und damit signifikant schlechter ab als unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen ($59,7\% \pm 0,9\%$). Vergleichbare Daten wurden bei E/T-Verhältnissen von 5:1 und 1:1 erhalten.

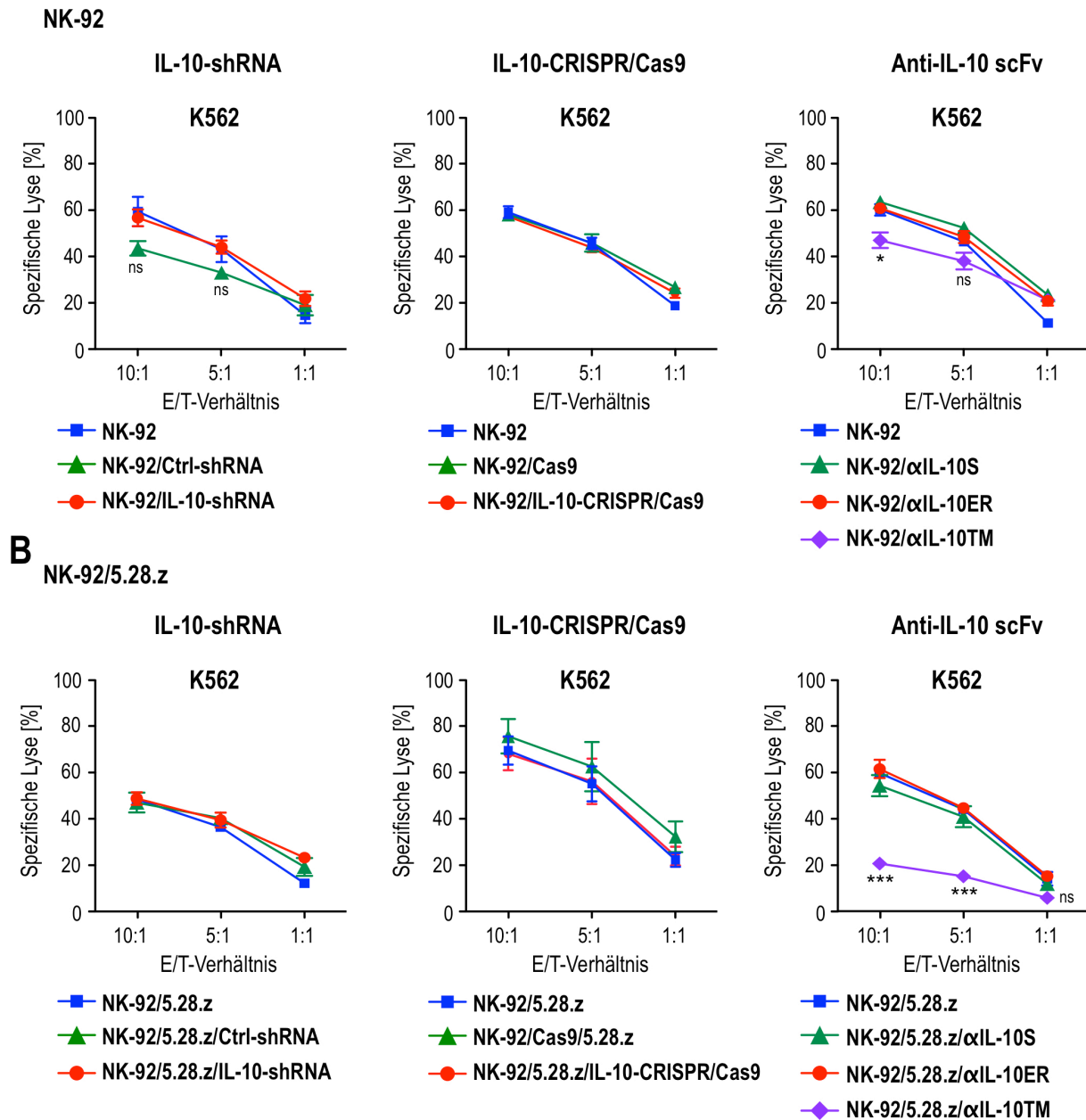


Abb. 4.17: Natürliche Zytotoxizität parentaler und CAR-exprimierender NK-92 Zellen nach IL-10 Depletion. Unter Einsatz einer IL-10-spezifischen shRNA (links), eines CRISPR/Cas9-vermittelte Gen-*knockouts* (Mitte) und der intrazellulären Expression von scFv-Antikörpern (rechts) wurde untersucht, ob die Hemmung der Expression und Sekretion von IL-10 die natürliche Zytotoxizität parentaler (A) und ErbB2-spezifischer CAR NK-92 Zellen (B) beeinflusst. Die Zielzelllinie K562 wurde mit Calcein Violet (CV) angefärbt und in verschiedenen Effektor/*Target* (E/T)-Verhältnissen mit NK-92 Zellen gemischt. Nach zweistündiger Ko-Inkubation wurden lysierte Tumorzellen mit einer Propidiumiodid-Lösung (PI) angefärbt und der Prozentsatz CV und PI doppelt positiver K562 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Von den erhaltenen Werten wurde die Prozentzahl der spontanen Lyse nach Inkubation der Tumorzellen ohne NK-Zellen subtrahiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten für jeden Ansatz. ***: $p < 0,001$; *: $p < 0,5$; ns: nicht signifikant.

Im Fall der ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zelllinie NK-92/5.28.z war nicht nur die Analyse des Einflusses der IL-10 Depletion auf die natürliche Zytotoxizität von Bedeutung, sondern auch die des Einflusses auf die CAR-vermittelte Tumorzelllyse. Hierzu wurden in einem 2 h

Zytotoxizitätsassay ErbB2-überexprimierende MDA-MB453 Tumorzellen als Zielzellen eingesetzt. ErbB2-negative MDA-MB468 Tumorzellen dienten als Kontrollansatz (Abb. 4.18).

NK-92/5.28.z

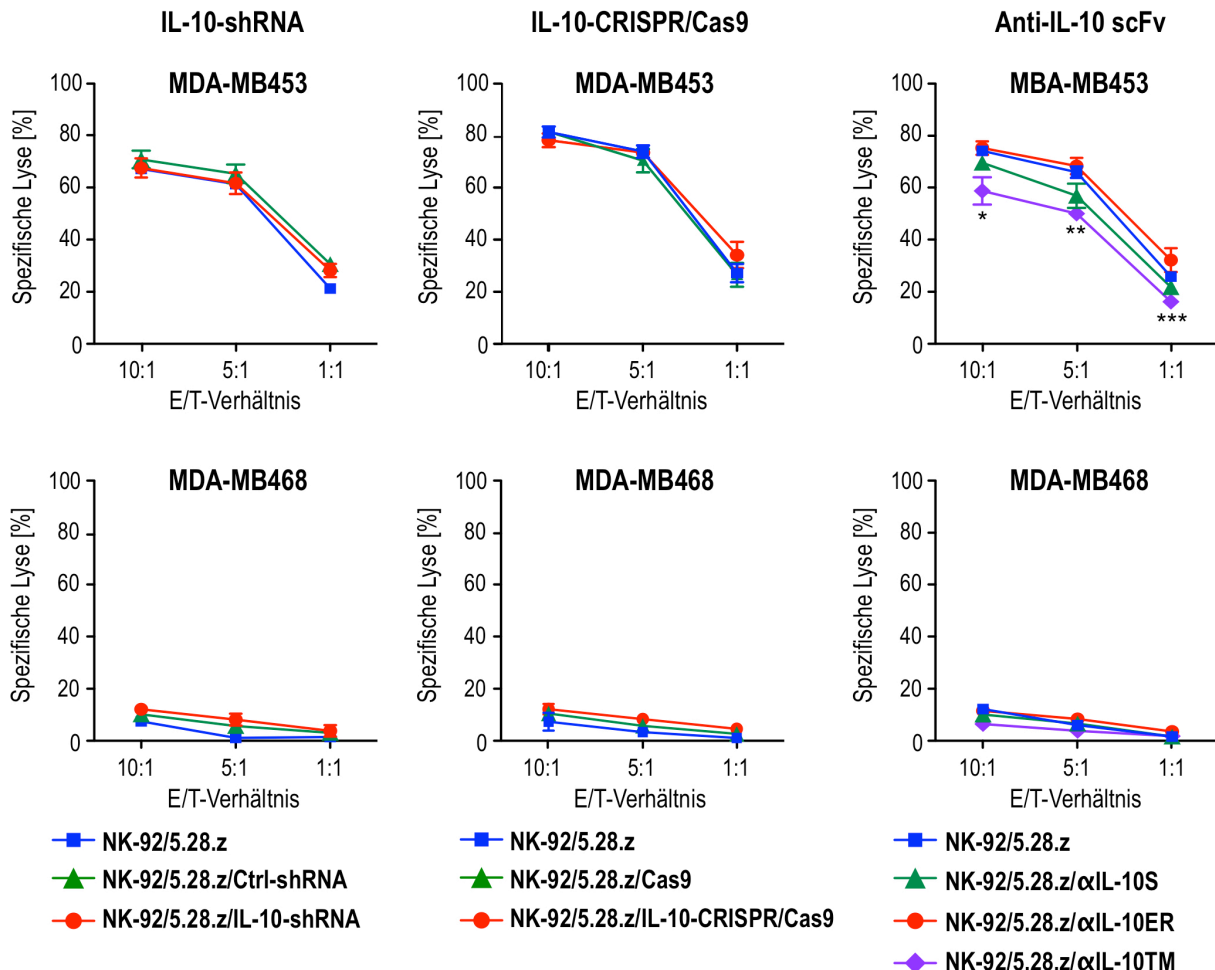


Abb. 4.18: Spezifische Zytotoxizität CAR-exprimierender NK-92/5.28.z Zellen nach IL-10 Depletion. Unter Einsatz einer IL-10-spezifischen shRNA (links), eines CRISPR/Cas9-vermittelte Genknockouts (Mitte) und der intrazellulären Expression von scFv-Antikörpern (rechts) wurde untersucht, ob die Hemmung der Expression und Sekretion von IL-10 die CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen gegenüber ErbB2-überexprimierenden MDA-MB453 Tumorzellen beeinflusst (obere Reihe). ErbB2-negative MDA-MB468 Zellen wurden als Kontrollansatz mitgeführt (untere Reihe). Von den erhaltenen Werten wurde die Prozentzahl der spontanen Lyse nach Inkubation der Tumorzellen ohne NK-Zellen subtrahiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten für jeden Ansatz. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,5$.

Für die ErbB2-überexprimierenden MDA-MB453 Tumorzellen wurde eine hohe Lyse durch unmodifizierte und shRNA-exprimierende NK-92/5.28.z Effektorzellen beobachtet. So betrug der Anteil abgetöteter MDA-MB453 Zellen bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 durchschnittlich $67,3\% \pm 0,8\%$ für NK-92/5.28.z Zellen, $71,0\% \pm 2,7\%$ für NK-92/5.28.z/Ctrl-shRNA Zellen und $67,6\% \pm 3,0\%$ für NK-92/5.28.z/IL-10-shRNA Zellen. Damit bestand zwischen den Effektorzellen kein signifikanter Unterschied in der Zytotoxizität gegenüber MDA-MB453 Zellen. Auch beim Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems konnte keine wesentliche Abweichung

in der Lyse zwischen den getesteten Effektorzellen festgestellt werden. So lysierten NK-92/5.28.z Zellen mit vollständigem IL-10 *knockout* auf DNA-Ebene die Zielzellen bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 im Durchschnitt zu $78,3\% \pm 2,1\%$. Dies unterschied sich nur unwesentlich von der Lyse durch Cas9-exprimierende NK-92/5.28.z Kontrollzellen von $81,6\% \pm 1,6\%$ und durch unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen von $81,5\% \pm 1,6\%$. MDA-MB453 Zellen erwiesen sich auch sensitiv gegenüber anti-IL-10 scFv-Antikörper-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen. Hierbei war kein signifikanter Unterschied in der Lyse der Tumorzellen durch α IL-10S ($69,5\% \pm 1,5\%$)- und α IL-10ER ($75,2\% \pm 2,1\%$)-exprimierende und unmodifizierte ($74,1\% \pm 1,1\%$) NK-92/5.28.z Zellen festzustellen. Diese Daten zeigen somit, dass endogen produziertes IL-10 keine Rolle für die CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen spielt. Wie schon im Fall der natürlichen Zytotoxizität beobachtet, beeinträchtigte die Expression des α IL-10TM-Antikörpers allerdings auch die CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen. So wurden bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 im Vergleich zur Lyse von $74,1\% \pm 1,1\%$ durch unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen die ErbB2-positiven MDA-MB453 Zellen von NK-92/5.28.z/ α IL-10TM Zellen nur zu $58,7\% \pm 4,2\%$ und damit signifikant schlechter abgetötet. Ähnliches wurde auch bei E/T-Verhältnissen von 5:1 und 1:1 beobachtet. Somit ist festzuhalten, dass sich die Expression des α IL-10TM-Antikörpers in parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen nachteilig auf die Proliferation und Funktion der Zellen auswirkt. Da derartige Effekte im Fall der scFv-Antikörper α IL-10S und α IL-10ER nicht beobachtet wurden, ist davon auszugehen, dass diese nicht mit der IL-10 Depletion zusammenhängen.

ErbB2-negative MDA-MB468 Zellen wurden wie erwartet weder von unmodifizierten noch von IL-10-depletierten NK-92/5.28.z Zellen lysiert.

4.4.3 Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch IL-10-depletierte NK-92 Zellen

Aktivierte NK-Zellen sekretieren neben IL-10 auch eine Reihe pro-inflammatorischer Zytokine. So produzieren ErbB2-spezifische NK-92/5.28.z Zellen nach Aktivierung durch ErbB2-positive Tumorzellen unter anderem IFN- γ und TNF- α (Nowakowska et al., 2018; Schonfeld et al., 2015). Es stellte sich daher die Frage, ob eine IL-10 Depletion in NK-92 Zellen die Freisetzung solcher Zytokine nach Zielzellkontakt beeinflusst. Dazu wurden IL-10-depletierte parentale oder ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen mit der gleichen Anzahl an K562 oder MDA-MB453 Tumorzellen für 6 h ko-inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und mit Hilfe eines *Cytometric Bead Array* auf den Gehalt an IFN- γ , MIP-1 α und TNF- α untersucht.

Dabei wurde festgestellt, dass nicht aktivierte parentale NK-92 Zellen nur unwesentliche Mengen an IFN- γ sekretierten (Abb. 4.19). Gleiches wurde für nicht aktivierte NK-92 Zellen beobachtet, in denen die IL-10 Produktion mittels shRNA, CRISPR/Cas9 oder intrazellulär

exprimierter scFv-Antikörper gestört war. Wurden unmodifizierte oder IL-10-depletierte NK-92 Zellen mit K562 Tumorzellen ko-inkubiert, so erhöhte sich die IFN- γ Konzentration in den Kulturüberständen. Im Fall unmodifizierter NK-92 Zellen ergab sich dabei eine Konzentration von 0,40 ng/ml IFN- γ . Die IFN- γ Ausschüttung aktivierter Ctrl-shRNA-exprimierender NK-92 Zellen betrug dagegen 0,24 ng/ml und war damit deutlich erniedrigt, allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant. Da NK-92/Ctrl-shRNA Zellen in einem vorherigen Experiment K562 Tumorzellen schlechter lysierten als die mitgeführten unmodifizierten NK-Zellen (Abb. 4.17), ist zu vermuten, dass sowohl die reduzierte IFN- γ Ausschüttung als auch die verringerte Zytotoxizität auf eine beeinträchtigte Aktivierung der Zellen zurückzuführen sind. Die Depletion der IL-10 Expression durch die IL-10-spezifische shRNA beeinflusste die IFN- γ Sekretion nach Aktivierung im Vergleich zu den unmodifizierten NK-Zellen nur unwesentlich. So wurde für diese Zellen eine IFN- γ Konzentration von 0,48 ng/ml gemessen. Auch bei Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems unterschieden sich die IFN- γ Konzentrationen im Kulturüberstand der unmodifizierten (0,23 ng/ml), Cas9 (0,22 ng/ml)- und IL-10-CRISPR/Cas9 (0,27 ng/ml)-exprimierenden NK-92 Zellen nach Aktivierung kaum. Im Fall der intrazellulären Expression von anti-IL-10 Antikörpern ähnelte die IFN- γ Sekretion aktivierter NK-92/ α IL-10S Zellen (0,25 ng/ml) der mitgeführten unmodifizierten NK-92 Zellen (0,27 ng/ml). Im Vergleich dazu war die IFN- γ Ausschüttung aktivierter NK-92/ α IL-10ER Zellen (0,19 ng/ml) erniedrigt, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war. Bei aktivierten NK-92/ α IL-10TM Zellen (0,16 ng/ml) war die IFN- γ Ausschüttung im Vergleich zu den unmodifizierten NK-92 Zellen dagegen signifikant reduziert.

Im Gegensatz zu parentalen NK-92 Zellen wurde für unmodifizierte und IL-10-depletierte NK-92/5.28.z Zellen bereits im nicht aktivierten Zustand eine IFN- γ Ausschüttung von bis zu 0,41 ng/ml gemessen (Abb. 4.19 B). Dies entsprach in etwa der IFN- γ Sekretion parentaler NK-92 Zellen nach Aktivierung. Wurden NK-92/5.28.z Zellen mit der ErbB2-überexprimierenden Tumorzelllinie MDA-MB453 stimuliert, erhöhte sich die IFN- γ Konzentration im Zellkulturüberstand deutlich. Für NK-92/5.28.z/Ctrl-shRNA und NK-92/5.28.z/IL-10-shRNA Zellen wurden nach Aktivierung mit MDA-MB453 Tumorzellen IFN- γ Konzentrationen von 5,44 ng/ml und 6,08 ng/ml ermittelt, welche unwesentlich von der IFN- γ Ausschüttung der mitgeführten unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen von 5,92 ng/ml abwichen. Ähnliches wurde bei Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems beobachtet. Hier betrugen die gemessenen IFN- γ Konzentrationen 5,01 ng/ml für unmodifizierte, 4,72 ng/ml für Cas9-exprimierende und 5,37 ng/ml für IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen. Auch die intrazelluläre Expression des IL-10 scFv-Antikörpers α IL-10ER in NK-92/5.28.z Zellen beeinflusste die IFN- γ Ausschüttung nach Aktivierung im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen nur unwesentlich. So wurde für α IL-10ER-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen eine IFN- γ Konzentration von 6,93 ng/ml und für unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen von

7,77 ng/ml im Zellkulturüberstand gemessen. Für aktivierte α IL-10S-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen wurde eine zu unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen nicht signifikant erhöhte IFN- γ Konzentration von 9,82 ng/ml im Überstand nachgewiesen. Interessanterweise wurde der bereits in parental NK-92 Zellen beobachtete Effekt der α IL-10TM Expression auf die IFN- γ Ausschüttung auch im Fall der α IL-10TM-exprimierenden NK-92/5.28.z festgestellt. So wurde für NK-92/5.28.z/ α IL-10TM Zellen nach Aktivierung nur eine IFN- γ Konzentration von 4,50 ng/ml ermittelt, welche im Vergleich zu der gemessenen IFN- γ Konzentration bei unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen signifikant erniedrigt war. Da α IL-10TM-exprimierende parentale NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen im vorangegangenen Experiment Tumorzellen deutlich schlechter lysierten als unmodifizierte NK-92 Zellen (Abb. 4.17, 4.18), weist auch hier die reduzierte IFN- γ Sekretion auf eine beeinträchtigte Aktivierung der NK-92 Zellen durch die Expression des α IL-10TM-Antikörpers hin.

Dessen ungeachtet ist aus den Daten insgesamt zu schließen, dass die IL-10 Depletion in parental und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen die Produktion von IFN- γ nicht wesentlich beeinflusst.

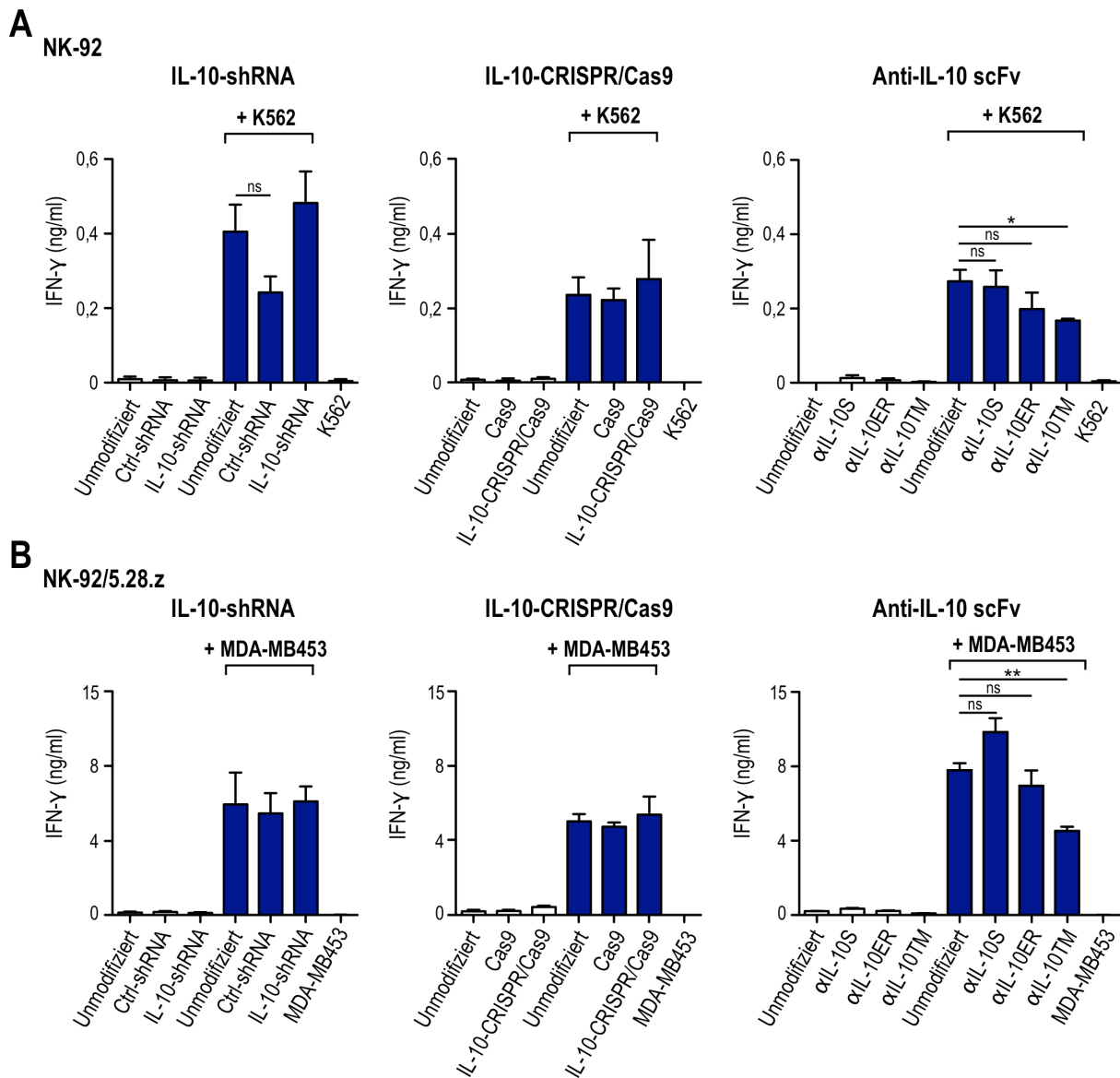


Abb. 4.19: IFN-γ Sekretion IL-10-depletierter parentaler und CAR-exprimierender NK-92 Zellen nach Zielzellkontakt. Parentale NK-92 (A) oder NK-92/5.28.z Zellen (B) mit manipulierter IL-10 Expression wurden im Verhältnis 1:1 mit K562 (oben) oder ErbB2-positiven MDA-MB453 Tumorzellen (unten) für 6 h bei 37°C ko-inkubiert. Unmodifizierte NK-92 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde die Konzentration von IFN-γ in den Zellkulturüberständen mittels *Cytometric Bead Array* bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten. **: $p < 0,01$, *: $p < 0,5$; ns: nicht signifikant.

Neben der Ausschüttung von IFN-γ wurde auch die Sekretion von MIP-1α in den Zellkulturüberstand untersucht (Abb. 4.20). Hier zeigte sich, dass unmodifizierte NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen bereits in Abwesenheit von Zielzellen MIP-1α in relativ hohen Mengen von bis zu 4,28 ng/ml (NK-92) bzw. 7,86 ng/ml (NK-92/5.28.z) ausschütteten. Die MIP-1α Sekretion wurde nach Zielzellkontakt weiter gesteigert. So wurde für unmodifizierte NK-92 Zellen nach Aktivierung mit K562 Zellen eine MIP-1α Konzentration von 31,9 ng/ml ermittelt (Abb. 4.20 A). Diese unterschied sich nur unwesentlich von der IL-10-shRNA-exprimierender NK-92 Zellen (31,5 ng/ml). Im Vergleich dazu war die MIP-1α Konzentration im Überstand der aktivierten

NK-92/Ctrl-shRNA Zellen leicht erniedrigt (25,9 ng/ml). Kein merklicher Unterschied wurde in der MIP-1 α Konzentration im Überstand Cas9-exprimierender NK-92 Zellen (21,8 ng/ml) im Vergleich zu IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierenden NK-92 Zellen (22,6 ng/ml) festgestellt. Die Menge des sekretierten MIP-1 α im Überstand der auch in diesem Experiment mitgeführten unmodifizierten NK-92 Zellen war mit 21,3 ng/ml vergleichbar. Die intrazelluläre Expression der IL-10 scFv-Antikörper α IL-10S, α IL-10ER und α IL-10TM in NK-92 Zellen führte nach Aktivierung der Zellen zu einer MIP-1 α Ausschüttung von 25,3 ng/ml (NK-92/ α IL-10S), 24,4 ng/ml (NK-92/ α IL-10ER) und 26,8 ng/ml (NK-92/ α IL-10TM) und unterschied sich damit nur unwesentlich von der MIP-1 α Ausschüttung unmodifizierter Zellen von 28,1 ng/ml. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Hemmung der IL-10 Sekretion keinen nennenswerten Einfluss auf die MIP-1 α Sekretion von parentalen NK-92 Zellen ausübt.

Die MIP-1 α Ausschüttung von NK-92/5.28.z wurde nach Aktivierung mit Zielzellen ebenfalls weiter gesteigert (Abb. 4.20 B). Die Expression der IL-10-spezifischen shRNA führte zu keinem wesentlichen Unterschied der MIP-1 α Sekretion (43,7 ng/ml) nach Aktivierung mit ErbB2-exprimierenden MDA-MB453 Tumorzellen im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen (46,9 ng/ml). Allerdings zeigte sich eine leicht niedrigere MIP-1 α Konzentration im Überstand der Ctrl-shRNA-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen (37,5 ng/ml). In einem separaten, davon unabhängigen Experiment wurde festgestellt, dass IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen ähnliche Mengen an MIP-1 α (35,1 ng/ml) in den Zellkulturüberstand sekretierten wie Cas9-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen (31,2 ng/ml) und unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen (31,7 ng/ml). Die MIP-1 α Konzentration im Überstand aktivierter NK-92/5.28.z/ α IL-10S Zellen betrug 56,8 ng/ml und wich damit kaum von der gemessenen Konzentration von 55,9 ng/ml im Fall der unmodifizierten Zellen ab. Für aktivierte NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen wurde eine verringerte MIP-1 α Ausschüttung von 45,1 ng/ml gemessen, allerdings war der Unterschied zu unmodifizierten Zellen statistisch nicht signifikant. Die MIP-1 α Ausschüttung der α IL-10TM-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen war sogar auf 39,6 ng/ml erniedrigt. Da eine derartige Beeinträchtigung der MIP-1 α Ausschüttung in parentalen NK-92 Zellen nicht beobachtet wurde, deuten die Daten darauf hin, dass die nachteilige Beeinflussung der NK-92/5.28.z Zellen durch die α IL-10TM-Expression stärker ist als in parentalen NK-92 Zellen, was sich auch in den Zytotoxizitätsstudien zeigte (Abb. 4.17). Ungeachtet dessen ist aus den gewonnenen Daten insgesamt zu entnehmen, dass sich die Hemmung der IL-10 Expression in NK-92/5.28.z Zellen nicht nachteilig auf die MIP-1 α Sekretion auswirkte.

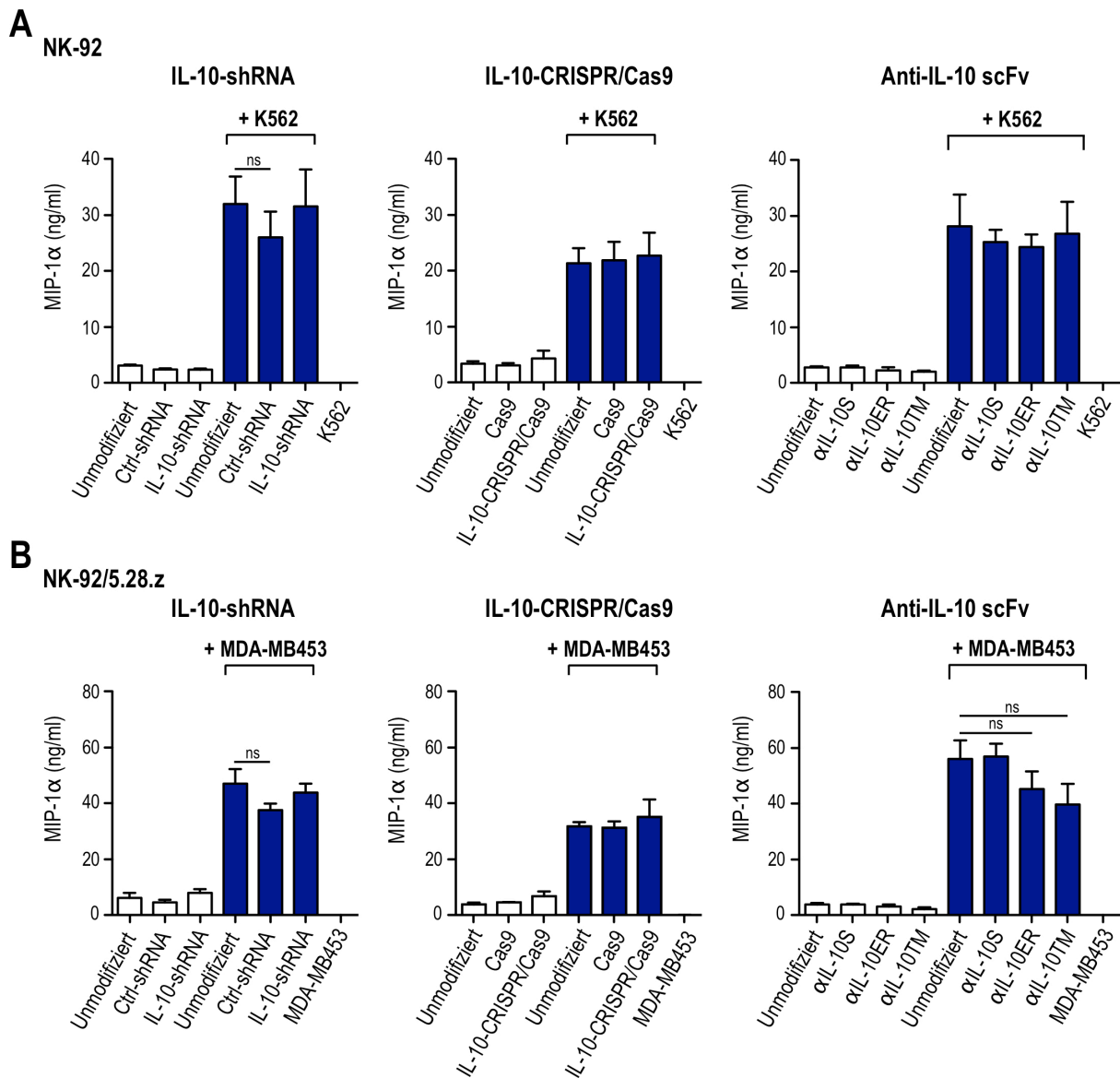


Abb. 4.20: MIP-1α Sekretion IL-10-depletierter parentaler und CAR-exprimierender NK-92 Zellen nach Zielzellkontakt. Parentale NK-92 (**A**) oder NK-92/5.28.z Zellen (**B**) mit manipulierter IL-10 Expression wurden im Verhältnis 1:1 mit K562 (oben) oder ErbB2-positiven MDA-MB453 Tumorzellen (unten) für 6 h bei 37°C ko-inkubiert. Unmodifizierte NK-92 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde die Konzentration von MIP-1α in den Zellkulturüberständen mittels *Cytometric Bead Array* bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten. ns: nicht signifikant.

Eine Sekretion von TNF-α konnte für unmodifizierte und IL-10-depletierte NK-92 Zellen sowohl in Abwesenheit von K562 Tumorzellen als auch im aktivierten Zustand nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nicht aktivierte NK-92/5.28.z Zellen schütteten ebenfalls keine nachweisbaren Mengen an TNF-α in den Zellkulturüberstand aus (Abb. 4.21). Erst die CAR-vermittelte Aktivierung der NK-92/5.28.z Zellen durch ErbB2-positive MDA-MB453 Zellen induzierte eine messbare Sekretion von TNF-α, die allerdings im Vergleich zu den sekretierten Mengen von IFN-γ und MIP-1α eher gering war. Eine erhöhte Menge an TNF-α wurde nach Ko-Kultivierung IL-10-shRNA-exprimierender NK-92/5.28.z (0,43 ng/ml) mit den Zielzellen im

Vergleich zu aktivierten unmodifizierten (0,27 ng/ml) und Ctrl-shRNA-exprimierenden (0,24 ng/ml) NK-92/5.28.z Zellen gemessen. Auch die Expression des scFv-Antikörpers α IL-10ER in NK-92/5.28.z Zellen führte zu einer gesteigerten TNF- α Konzentration (0,82 ng/ml) im Zellkulturüberstand, wohingegen sich die TNF- α Sekretion von α IL-10S (0,33 ng/ml)- und α IL-10TM (0,51 ng/ml)-exprimierenden Zellen nur unwesentlich von der unmodifizierter NK-Zellen (0,42 ng/ml) unterschied. Allerdings waren die gemessenen Unterschiede zu unmodifizierten Zellen statistisch nicht signifikant. In einem davon unabhängig durchgeführten Experiment konnte jedoch eine signifikant erhöhte TNF- α Ausschüttung α IL-10ER-exprimierender NK-92/5.28.z Zellen im Vergleich zu unmodifizierten Zellen nach Aktivierung mit B16-F10/ErbB2 Tumorzellen beobachtet werden (Abb. 4.27). Die mit NK-92/5.28.z/ α IL-10ER erhaltenen Daten lassen vermuten, dass IL-10 die TNF- α Sekretion der Zellen nachteilig beeinflusst. Im Widerspruch dazu stehen allerdings die Ergebnisse mit CRISPR/Cas9-editierten NK-92/5.28.z Zellen. So wurde für NK-92/5.28.z/IL-10-CRISPR/Cas9 Zellen eine ähnliche TNF- α Konzentration (0,31 ng/ml) im Zellkulturüberstand gemessen wie für unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen (0,24 ng/ml). Allerdings war die TNF- α Ausschüttung der NK-92/5.28.z/IL-10-CRISPR/Cas9 Zellen im Vergleich zu Cas9-exprimierender NK-92/5.28.z Zellen signifikant erniedrigt (0,60 ng/ml). Hierbei ist anzumerken, dass in vorangegangenen Analysen der Zellpools ähnliche TNF- α Mengen im Zellkulturüberstand unmodifizierter und Cas9-exprimierender NK-92/5.28.z Zellen ermittelt wurden, während die TNF- α Konzentration des IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellpools signifikant erniedrigt war (Daten nicht gezeigt). Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass sich die vollständige Eliminierung und die Verminderung der IL-10 Expression in NK-92/5.28.z Zellen je nach gewähltem Ansatz unterschiedlich auf die TNF- α Sekretion auswirken kann.

NK-92/5.28.z

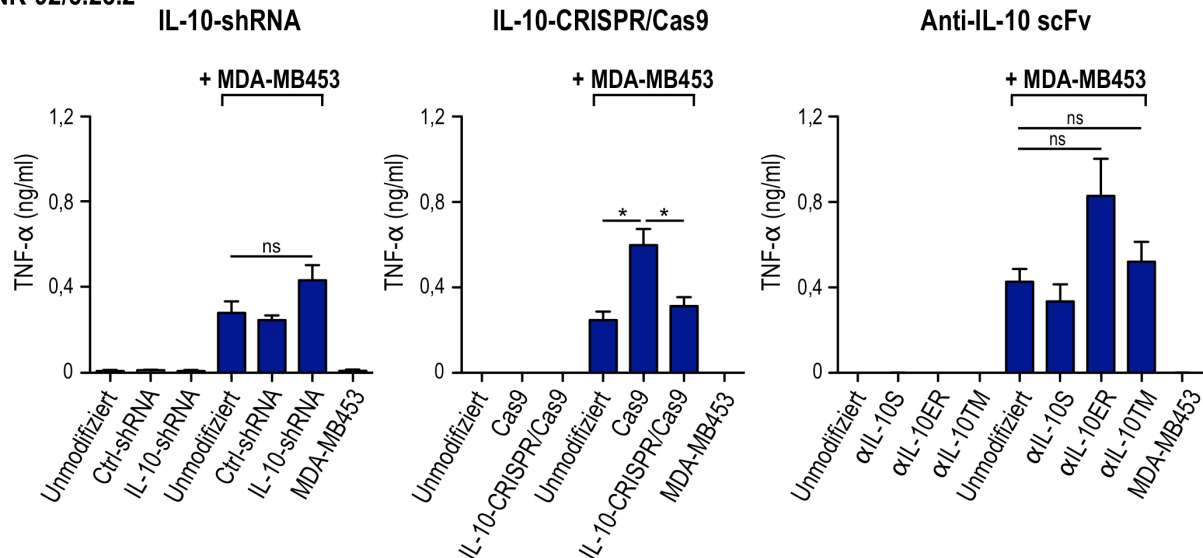


Abb. 4.21: TNF-α Sekretion IL-10-depletierter NK-92/5.28.z Zellen nach Zielzellkontakt. NK-92/5.28.z Zellen mit manipulierter IL-10 Expression wurden im Verhältnis 1:1 mit ErbB2-positiven MDA-MB453 Tumorzellen für 6 h bei 37°C ko-inkubiert. Unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde die Konzentration von TNF-α in den Zellkulturüberständen mittels *Cytometric Bead Array* bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten. *: $p < 0,5$; ns: nicht signifikant.

4.4.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1 bis 4.4.3

Es wurde untersucht, ob die Verminderung oder vollständige Eliminierung der IL-10 Expression in parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen einen Einfluss auf das Wachstum, die natürliche und CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine von NK-92 Zellen ausübt. Es zeigte sich, dass das Einbringen der IL-10-spezifischen shRNA keinen wesentlichen Einfluss auf die Proliferation, die natürliche und CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität und die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und MIP-1 α von parentalen NK-92 und CAR-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen im Vergleich zu unmodifizierten Zellen hatte. Hingegen wurden unerwartete Effekte der Ctrl-shRNA auf das Wachstum und die Funktionalität der NK-92 Zellen beobachtet. So führte die Ctrl-shRNA Expression in NK-92/5.28.z Zellen zu einem signifikant langsameren Wachstum und zu einer reduzierten MIP-1 α Ausschüttung, wohingegen parentale Ctrl-shRNA-exprimierende NK-92 Zellen K562 Tumorzellen schlechter lysierten und weniger IFN- γ ausschütteten als die jeweils mitgeführten Kontrollzellen. Somit lassen die Daten einen von IL-10 unabhängigen unspezifischen Effekt der Ctrl-shRNA vermuten. Im Vergleich zu unmodifizierten Zellen beeinflusste die vollständige Eliminierung der IL-10 Expression mittels CRISPR/Cas9 Gen-Editierung das Wachstum, die Zytotoxizität und die Ausschüttung der Zytokine IFN- γ und MIP-1 α von parentalen NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen nicht. Gleiches wurde für NK-92 Zellen beobachtet, die den α IL-10S-Antikörper exprimierten. Die Expression des α IL-10ER Antikörpers reduzierte die MIP-1 α Ausschüttung aktivierter NK-92/5.28.z Zellen, wobei der beobachtete Unterschied zu den Kontrollzellen statistisch nicht signifikant war.

Hingegen führte die Expression des α IL-10TM Antikörpers zu einer deutlichen Beeinträchtigung der NK-92 Zellen. So proliferierten α IL-10TM-exprimierende parentale und ErbB2-spezifische NK-92 Zellen langsamer und töteten K562 Tumorzellen deutlich schlechter ab als unmodifizierte Zellen. Zudem sekretierten aktivierte α IL-10TM-exprimierende NK-92 Zellen signifikant weniger IFN- γ in den Kulturüberstand als die jeweils mitgeführten Kontrollzellen. Auch die CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität und die MIP-1 α Ausschüttung von NK-92/5.28.z Zellen wurden nachteilig beeinflusst. Die Ursache hierfür könnte im Aufbau des α IL-10TM Antikörpers liegen, da derartige Effekte für α IL-10ER- oder α IL-10S Antikörper-exprimierende NK-92 Zellen nicht festgestellt wurden. ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen sekretierten nach Kontakt mit ErbB2-exprimierenden Tumorzellen das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α , was für aktivierte parentale NK-92 Zellen nicht der Fall war. Dabei war auffällig, dass IL-10-shRNA- und α IL-10ER-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen mehr TNF- α ausschütteten als die jeweils mitgeführten Kontrollzellen. Im Widerspruch dazu stehen die mit IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen erhaltenen Daten, deren TNF- α Konzentration im Kulturüberstand nach Aktivierung im Vergleich zu Cas9-exprimierenden Zellen signifikant erniedrigt war.

4.5 Einfluss der IL-10 Depletion in NK-92 Zellen auf ko-kultivierte Immunzellen

In der Literatur wurde beschrieben, dass NK-Zellen bidirektional mit DCs und Makrophagen interagieren und sich wechselseitig beeinflussen (siehe 1.3.3). Makrophagen und DCs sind Antigen-präsentierende Zellen, die unerlässlich für die Induktion einer Tumor-spezifischen adaptiven Immunantwort sind. NK-Zellen nehmen u.a. durch die Sekretion immunregulatorischer Zytokine Einfluss auf die genannten Zelltypen. So fördert das von NK-Zellen sekretierte IFN- γ die Polarisierung von Makrophagen zu einem M1-Phänotyp, der Tumorzellen direkt abtötet und die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T-Helfer-Zellen des Th1-Subtyps begünstigt (Biswas and Mantovani, 2010; Mantovani and Sica, 2010). Neben IFN- γ schütten NK-Zellen auch TNF- α aus. Beide Zytokine sind nachweislich an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt (Vitale et al., 2005a). In der Folge initiieren reife DCs in den umliegenden Lymphknoten die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen (Banchereau et al., 2000). Aktivierte NK-Zellen und CAR NK-Zellen sezernieren jedoch auch das immunregulatorische IL-10, das diesen pro-inflammatorischen Faktoren entgegenwirken kann. So beeinträchtigt IL-10 die Reifung dendritischer Zellen, was sich u.a. in einer verminderten Oberflächenexpression von CD80, CD83, CD86 und HLA-DR, sowie in einer reduzierten IL-12 Sekretion widerspiegelt (Corinti et al., 2001; De Smedt et al., 1997). Makrophagen polarisieren nach Behandlung mit IL-10 in einen M2-Phänotyp, der immunsuppressive Eigenschaften aufweist und zur Tumorprogression beiträgt (Murray and Wynn, 2011). Daher wurde im

Folgenden untersucht, welchen Einfluss die von CAR-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen sekretierten Botenstoffe auf die Reifung von DCs und die Polarisierung von Makrophagen haben und inwiefern sich eine IL-10 Depletion in NK-92/5.28.z Zellen auf diese Prozesse auswirkt. Dazu wurden *in vitro* Transwell-Experimente mit Monozyten-abgeleiteten DCs (MoDC) oder Makrophagen (MDM) und α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen, oder parentalen CAR NK-92 Zellen in Anwesenheit des rekombinanten anti-IL-10 Mini-Antikörpers durchgeführt.

4.5.1 Expression Reifungs-assoziiierter-Oberflächenmarker von dendritischen Zellen in Gegenwart von α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen

Da die Reifung dendritischer Zellen essentiell für eine effiziente Antigen-Präsentation und die Aktivierung von T-Zellen ist, wurde untersucht, ob die löslichen Faktoren von aktivierten NK-92/5.28.z Zellen die Reifung von dendritischen Zellen initiieren und eine IL-10 Depletion durch die Expression des α IL-10ER-Antikörpers diesen Prozess fördern kann.

Zunächst wurden Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (*monocyte-derived dendritic cells*, MoDC) generiert. Dazu wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes aus *Buffy-Coats* von gesunden Spendern mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anschließend wurden 2×10^6 isolierte PBMCs/cm² in einer 10 cm Kulturschale in Wachstumsmedium (RPMI⁺⁺⁺) ausgesät und für 2 h inkubiert. Da Monozyten an Plastikoberflächen adhären, wurden nicht-adhärenente Zellen nach der Inkubationszeit abgesaugt. Die verbliebenen Monozyten wurden gewaschen und mit Wachstumsmedium mit GM-CSF (50 ng/ml) und IL-4 (50 ng/ml) versetzt, um sie zu MoDC zu differenzieren. Um zu testen, ob es sich bei den entstandenen Suspensionszellen tatsächlich um unreife Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen handelt, wurden diese an Tag 6 auf die Expression der Marker CD45, CD14 und CD83 hin untersucht. Dabei war vor allem eine fehlende Expression von CD14 von Bedeutung, um dendritische Zellen von Monozyten und Makrophagen zu unterscheiden, welche sich durch eine starke CD14 Expression auszeichnen. In der Tat wurde auf den analysierten Suspensionszellen keine CD14 Expression detektiert, wohingegen der Leukozyten-Marker CD45 sehr stark exprimiert war (Daten nicht gezeigt). Für den Marker CD83 wurde eine sehr schwache Expression auf den Zellen nachgewiesen, was auf einen unreifen Phänotyp der generierten MoDC hindeutete (Daten nicht gezeigt).

Zur Durchführung eines Transwell-Experiments wurden unreife MoDC an Tag 5 der Kultur mit GM-CSF und IL-4 in eine 24-well Kulturplatte ausgesät. Anschließend wurden Zellkultureinsätze (ThinCert[™]) in die Kulturplatte eingesetzt, deren Boden aus einer für Zytokine und andere Faktoren durchlässigen Membran mit 0,4 μ m Porengröße bestand. In den Zellkultureinsätzen wurden parentale NK-92 Zellen und unmodifizierte oder α IL-10ER-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen in einem Verhältnis von 1:1 mit ErbB2-überexprimierenden

MDA-MB453 Zellen ko-inkubiert. Zudem wurden NK-Zellen oder Tumorzellen allein als Kontrollen mitgeführt. In einem unabhängigen Ansatz wurden unreife MoDC mit IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (25 ng/ml), PGE2 (1 μ g/ml) und TNF- α (10 ng/ml) stimuliert, um eine Reifung der dendritischen Zellen einzuleiten. Zudem wurden MoDC in Gegenwart von IL-10 (20 ng/ml) kultiviert. Nach 24 h wurden die MoDC geerntet und auf die Expression der Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR und PD-L1 mittels Mehrfarben-Durchflusszytometrie hin analysiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass die getesteten Oberflächenmarker vermehrt auf reifen dendritischen Zellen exprimiert sind (Banchereau and Steinman, 1998; Brown et al., 2003; Jonuleit et al., 1997). Für den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse wurden die MFI (*mean fluorescence intensity*) der untersuchten Marker behandelter MoDC ins Verhältnis zu denen unbehandelter Zellen gesetzt (Abb. 4.23).

Unbehandelte MoDC wiesen eine schwache Expression von CD83 auf, wohingegen CD80 und PD-L1 bereits sehr stark auf diesen Zellen exprimiert waren (repräsentativ für einen Donor in Abb. 4.22 gezeigt). Zudem wurde eine moderate Expression der Marker CD40, CD86 und HLA-DR auf den MoDC nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde die Expression aller genannten Marker nach Behandlung der Zellen mit IL-1 β , IL-6, PGE2 und TNF- α deutlich gesteigert, was auf eine Reifung der Zellen hindeutete (Abb. 4.23).

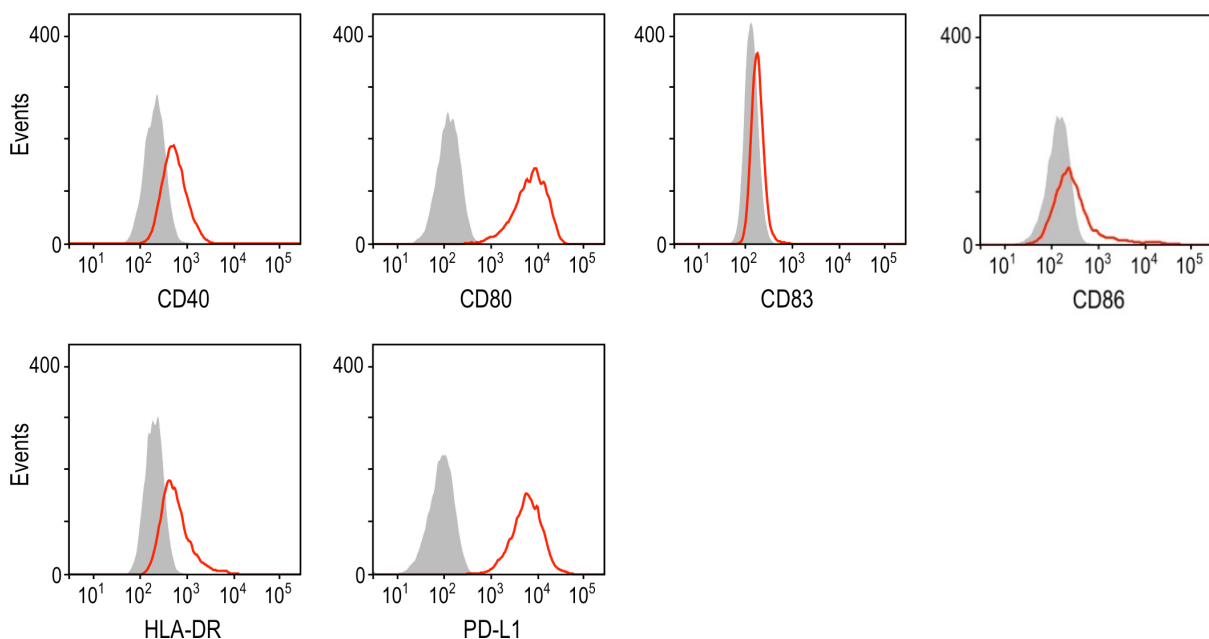


Abb. 4.22: Markerexpression auf unreifen MoDC. Repräsentativ ist die Oberflächenexpression der Marker CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR und PD-L1 auf MoDC eines Donors gezeigt, welche mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter Primärantikörper durchflusszytometrisch analysiert wurden (rote Linie). Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen (graue Fläche). MoDC: *monocyte-derived dendritic cells*.

Wurden unreife MoDC mit IL-10 behandelt, hatte dies keinen Einfluss auf die Expression von CD83, CD86 und HLA-DR. Hingegen wurde eine Zunahme der Expression von CD40, CD80 und PD-L1 beobachtet, die aber wesentlich weniger ausgeprägt war, als nach der Behandlung

mit IL-1 β , IL-6, PGE2 und TNF- α . Somit beeinflusste die IL-10 Behandlung den Phänotyp der MoDC kaum.

Die in den Zellkultureinsätzen allein kultivierten MDA-MB453 Tumorzellen hatten keinen nennenswerten Einfluss auf die Expression der untersuchten Marker auf MoDC. Ähnliches wurde für nicht aktivierte und mit Tumorzellen kultivierte parentale NK-92 Zellen beobachtet, allerdings lösten die sekretierten Botenstoffe eine moderate Expressionssteigerung von CD40 auf den MoDC aus. Dennoch kann eine durch MDA-MB453 Tumorzellen oder parentale NK-92 Zellen induzierte Reifung der MoDC ausgeschlossen werden.

Die sezernierten löslichen Faktoren nicht aktivierter NK-92/5.28.z Zellen führten zu einer Erhöhung der Expressionsniveaus von CD40, CD80 und PD-L1 auf unreifen MoDC. Die Expression von CD83, CD86 und HLA-DR hingegen unterschied sich nicht von der auf unbehandelten MoDC. Gleiches wurde für MoDC beobachtet, die den Zytokinen nicht aktivierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen ausgesetzt waren. Dabei wurde die Expression der Marker CD40, CD80 und PD-L1 auf MoDC in einem ähnlichen Ausmaß gesteigert wie durch unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen. Dies zeigte, dass sowohl unmodifizierte als auch α IL-10ER-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen in Abwesenheit von MDA-MB453 Tumorzellen nicht in der Lage waren, eine deutliche Reifung der MoDC zu induzieren.

Nach Aktivierung der unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen mit ErbB2-positiven MDA-MB453 Tumorzellen wurde jedoch eine merkliche Steigerung der Expression von CD40, CD80, CD86 und PD-L1 auf MoDC beobachtet, was auf eine verstärkte Sekretion löslicher Faktoren aktivierter NK-92/5.28.z Zellen zurückzuführen ist. Dabei wurde der Marker PD-L1 deutlich stärker exprimiert als auf IL-1 β , IL-6, PGE2 und TNF- α behandelten MoDC. Für HLA-DR wurde eine moderate Expressionssteigerung nachgewiesen, wohingegen sich das Expressionsniveau von CD83 nur unwesentlich von dem auf unbehandelten MoDC unterschied. Auch die sekretierten Botenstoffe von mit Tumorzellen stimulierten NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen induzierten eine verstärkte Expression der untersuchten Oberflächenmarker. Dabei war das Expressionsniveau von CD80 und PD-L1 ähnlich zu dem auf MoDC, die den Zytokinen aktivierter unmodifizierter NK-92/5.28.z Zellen ausgesetzt waren. Allerdings wurden Unterschiede hinsichtlich der CD40 Expression beobachtet. So exprimierten MoDC, die durch die löslichen Faktoren aktivierter unmodifizierter NK-92/5.28.z Zellen stimuliert wurden, mehr CD40 auf ihrer Oberfläche als MoDC, die mit den Botenstoffen aktivierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen inkubiert wurden. Die sezernierten Faktoren aktivierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen erhöhten dagegen die Oberflächenexpression der Reifungs-Marker CD83, CD86 und HLA-DR auf MoDC im Vergleich zum unbehandelten Kontrollansatz. Dabei ähnelte vor allem die HLA-DR Expression der mit IL-1 β , IL-6, PGE2 und TNF- α behandelten MoDC. Zudem waren die genannten Marker deutlich stärker exprimiert als auf MoDC, die durch aktivierte unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen beeinflusst wurden. Die erhaltenen Daten zeigen, dass die

löslichen Faktoren aktivierter NK-92/5.28.z Zellen die Reifung ko-kultivierter MoDC initiieren und dieser Prozess durch die IL-10 Depletion in α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen gefördert wird. IL-10 scheint dabei vor allem den pro-inflammatorischen Zytokinen IFN- γ und TNF- α entgegenzuwirken, die von aktivierten NK-92/5.28.z Zellen sekretiert werden (Abb. 4.19, Abb. 4.21) und nachweislich an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt sind. Zudem könnte die Reifung nicht nur durch die reduzierte IL-10 Produktion der NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen, sondern auch durch die im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen erhöhte TNF- α Sekretion dieser Zellen (Abb. 4.21, Abb. 4.27) begünstigt werden.

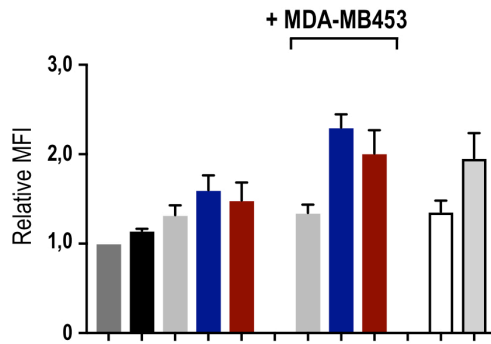
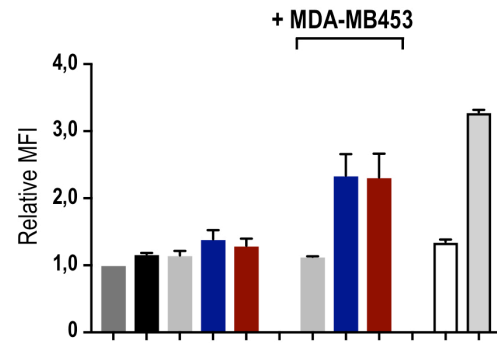
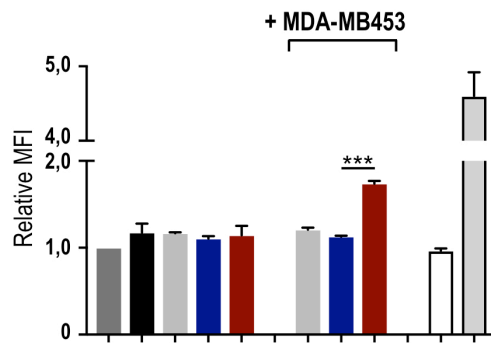
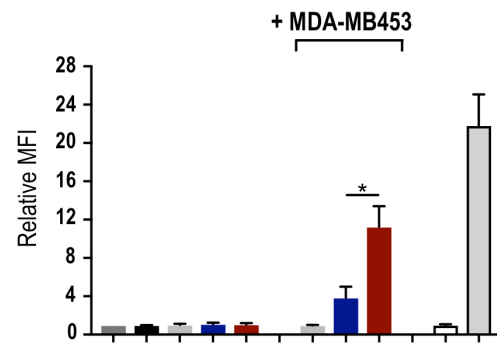
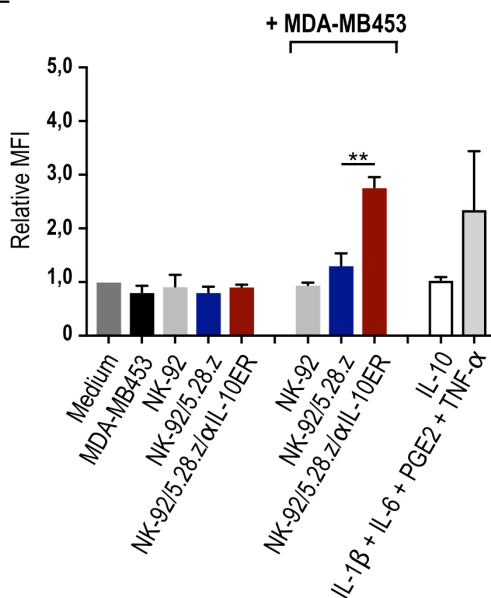
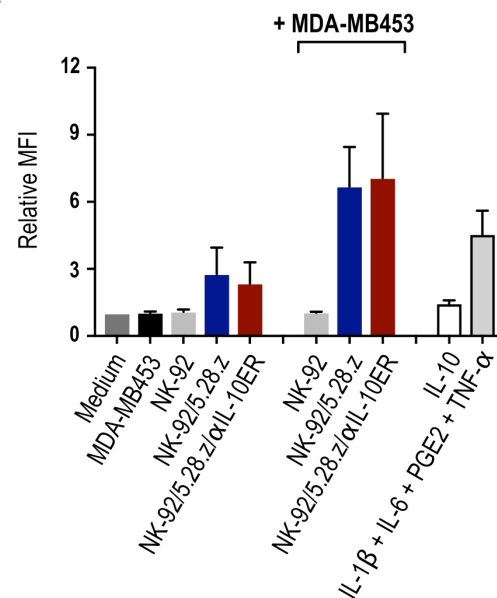
CD40**CD80****CD83****CD86****HLA-DR****PD-L1**

Abb. 4.23: Einfluss der von aktivierten NK-92/5.28.z/αIL-10ER sekretierten Faktoren auf die Reifung dendritischer Zellen. In eine 6-well Kulturplatte wurden unreife MoDC ausgesät, die durch einen Zellkultureinsatz von parentalen oder ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen in Ab- oder Anwesenheit von MDA-MB453 Tumorzellen getrennt wurden. Zudem wurden Ansätze mit IL-10-depletierten NK-92/5.28.z/αIL-10ER Zellen mitgeführt, um den Einfluss einer verminderten IL-10 Sekretion auf die Reifung der MoDC zu untersuchen. MoDC, welche mit IL-1β, IL-6, PGE2 und TNF-α stimuliert wurden, dienten als Kontrolle für die Differenzierung in reife MoDC. Weiterhin wurden unreife MoDC mit IL-10 behandelt. Nach 24 h wurden die MoDC geerntet und die Reifung der Zellen wurde anhand der Oberflächenexpression der Marker CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR und PD-L1 mittels Mehrfarben-Durchflusszytometrie analysiert. Für den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse wurden die MFI der untersuchten Marker behandelter MoDC ins Verhältnis zu denen unbehandelter Zellen gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. MFI: *mean fluorescence intensity*. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$.

4.5.2 Polarisierung von Makrophagen in Anwesenheit von NK-92/5.28.z und anti-IL-10 Mini-Antikörper

Für nachfolgende Untersuchungen zur Polarisierung von Makrophagen wurden diese zunächst aus Monozyten generiert. Dazu wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes aus *Buffy-Coats* von gesunden Spendern mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anschließend wurden Monozyten-haltige PBMCs in RPMI-Medium mit 5% humanem Plasma in einem Teflon-beschichteten Beutel ausgesät und für sieben Tage zu unpolarisierten, Monozyten-abgeleiteten Makrophagen (*monocyte-derived macrophages*, MDM) gereift. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD14, CD11b und CD11c hin analysiert, die verstärkt auf *in vitro* generierten Makrophagen exprimiert werden (Menck et al., 2014). In der Tat waren die MDM stark positiv für die genannten Marker (Daten nicht gezeigt). Zur Durchführung eines Transwell-Experiments wurden die generierten MDM in eine 6-well Kulturplatte ausgesät. Auch hier wurden Zellkultureinsätze (ThinCert™) verwendet, deren Boden aus einer für Zytokine und andere Faktoren durchlässigen Membran bestand. In diesen Einsätzen wurden parentale oder ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen in einem Verhältnis von 1:1 mit ErbB2-überexprimierenden MDA-MB453-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von 2 µg/ml eines IgG4-Fc Kontroll-Proteins oder des anti-IL-10 Mini-Antikörpers (siehe 4.2) ko-inkubiert. Parentale NK-92 Zellen und NK-92/5.28.z Zellen ohne Tumorzellen oder Tumorzellen allein wurden zum Vergleich mitgeführt. Zudem wurden Makrophagen in Abwesenheit von NK-Zellen mit IFN-γ (50 ng/ml) und LPS (10 ng/ml) oder mit IL-10 (20 ng/ml) stimuliert, um entweder einen M1- oder M2-ähnlichen Phänotyp zu induzieren. Nach 48 h wurden die Makrophagen geerntet und ihre Polarisierung anhand der Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86, HLA-DR, CD14 und CD163 mittels Mehrfarben-Durchflusszytometrie bestimmt. M1-Makrophagen zeichnen sich durch eine verstärkte Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86 und HLA-DR aus, wohingegen diese Zellen nur eine geringe Expression der Marker CD14 und CD163 aufweisen (Iqbal and Kumar, 2015; Martinez and Gordon, 2014). Im Gegensatz zu M1-Makrophagen regulieren IL-10-induzierte M2-Makrophagen die Expression der Oberflächenmarker CD86 und HLA-DR herunter und exprimieren vermehrt die Marker CD14 und CD163. Für den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse wurden die MFI der untersuchten Marker behandelter MDM ins Verhältnis zu denen unbehandelter Zellen gesetzt (Abb. 4.25).

Es zeigte sich, dass unpolarisierte MDM durchweg die Marker CD14, CD80, CD86 und HLA-DR exprimierten (repräsentativ für einen Donor in Abb. 4.24 gezeigt). Der Oberflächenmarker CD163 wurde hingegen nur sehr schwach auf den MDM detektiert. MDM, welche mit IFN-γ und LPS behandelt waren, polarisierten zu einem M1-ähnlichen Phänotyp, angezeigt durch eine erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86 und HLA-DR (Abb. 4.25). Weiterhin zeichneten sich die so behandelten Zellen durch eine verminderte CD14

und CD163 Expression aus. Durch die Behandlung mit rekombinantem IL-10 wurde dagegen ein M2-ähnlicher Phänotyp induziert. Auf den so behandelten Zellen wurde eine verminderte Expression von CD86 und HLA-DR nachgewiesen, wohingegen die Expression des Oberflächenmarkers CD14 erhöht war. Zudem wurde eine Zunahme der CD80 Expression gemessen, die aber wesentlich weniger ausgeprägt war als nach der Behandlung mit IFN- γ und LPS. Entgegen der Erwartung unterschied sich die CD163 Expression nur unwesentlich von der auf unbehandelten MDM, obwohl in der Literatur beschrieben ist, dass sich mit IL-10 behandelte Makrophagen u.a. durch eine erhöhte CD163 Expression auszeichnen (Iqbal and Kumar, 2015; Roszer, 2015).

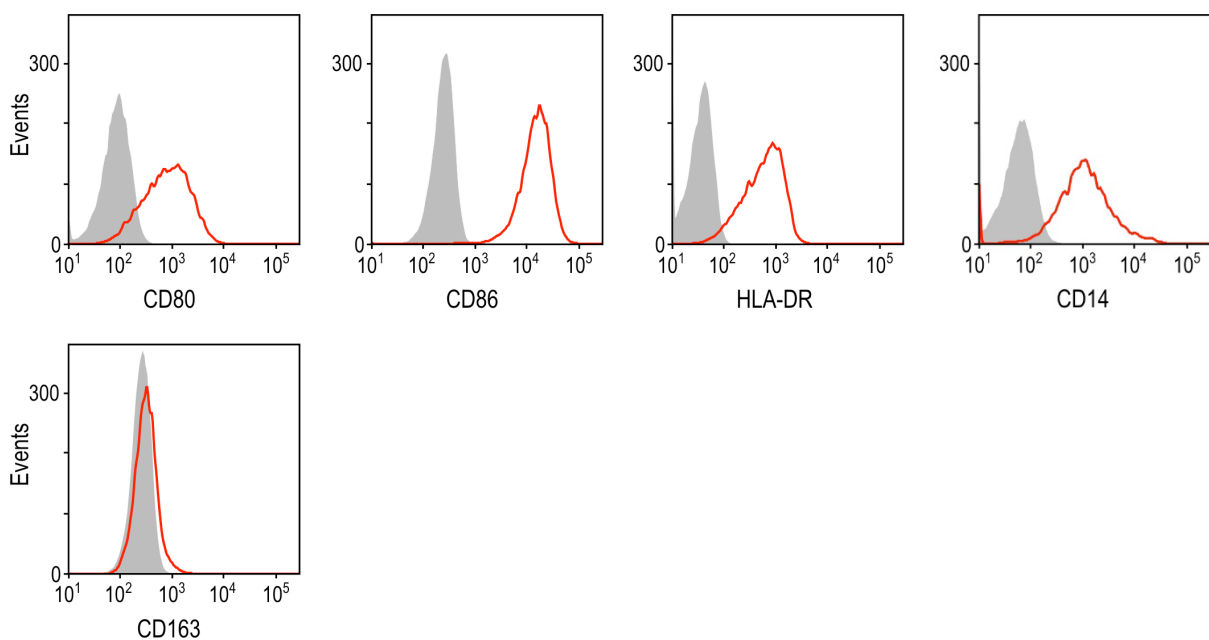


Abb. 4.24: Markerexpression auf unpolarisierten MDM. Repräsentativ ist die Oberflächenexpression der Marker CD80, CD86, HLA-DR, CD14 und CD163 auf MDM eines Donors gezeigt, welche mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter Primärantikörper durchflusszytometrisch analysiert wurden (rote Linie). Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen (graue Fläche). MDM: *monocyte-derived macrophages*.

Die in den Zellkultureinsätzen allein kultivierten MDA-MB453 Tumorzellen lösten keine Polarisierung der durch eine Membran getrennten MDM aus. Entsprechend unterschied sich die Oberflächenexpression der Marker CD80, CD86, HLA-DR und CD163 nicht von der auf unbehandelten MDM. Lediglich eine Zunahme der CD14 Expression wurde beobachtet, die allerdings weniger ausgeprägt war, als die auf IL-10 stimulierten MDM. Gleiches wurde für MDM nachgewiesen, die den löslichen Faktoren nicht aktivierter parentaler NK-92 ausgesetzt waren. So war auf den so behandelten Zellen ebenfalls die CD14 Expression erhöht, wohingegen kein nennenswerter Einfluss auf die Expression der übrigen Marker festgestellt werden konnte. Wurden parentale NK-92 Zellen mit MDA-MB453 Tumorzellen ko-inkubiert, so führten die sekretierten Botenstoffe zu einer geringen Zunahme der Expression der Marker CD80, CD14 und CD163 im Vergleich zu unbehandelten MDM, wohingegen die Expression

von CD86 und HLA-DR unbeeinflusst blieb. Damit hatten die löslichen Faktoren parentaler NK-92 Zellen kaum Einfluss auf die Polarisierung der MDM. Die etwas verstärkte CD163 und CD14 Expression lässt allenfalls eine schwache Induktion eines M2-ähnlichen Phänotyps vermuten.

Die sezernierten Faktoren nicht aktivierter NK-92/5.28.z Zellen initiierten eine Expressionssteigerung von CD80 und CD14, während die Marker CD86, HLA-DR und CD163 in einem ähnlichen Ausmaß exprimiert waren wie auf unbehandelten MDM. Dies deutet auf keine eindeutige Polarisierung in einen bestimmten Makrophagen-Phänotyp hin. Ähnliches wurde auch in Anwesenheit des IgG4-Fc Kontroll-Proteins beobachtet. So wurde die CD80 Expression in einem nahezu identischen Ausmaß gesteigert wie durch nicht aktivierte NK-92/5.28.z Zellen allein. Allerdings wurde im Vergleich zu Proben mit NK-92/5.28.z allein die Expression des Markers CD14 durch die Zugabe des IgG4-Fc Proteins weiter gesteigert. Zudem wurde eine Zunahme der CD163 Expression im Vergleich zu unbehandelten MDM gemessen, indessen blieb die Expression von CD86 und HLA-DR unbeeinflusst. Somit lässt sich auch hier schließen, dass eine tendenzielle Polarisierung der MDM hin zu einem M2-ähnlichen Phänotyp eingeleitet wird. Die Neutralisierung des sekretierten IL-10 nicht aktivierter NK-92/5.28.z Zellen durch die Zugabe des anti-IL-10 Mini-Antikörpers wirkte den durch NK-92/5.28 Zellen allein oder in Anwesenheit des IgG4-Kontroll-Proteins ausgelösten Effekte partiell entgegen. So wurde eine Zunahme der HLA-DR Expression beobachtet, wohingegen die Expression von CD14 nicht in dem Ausmaß gesteigert wurde wie auf MDM, die den sekretierten Botenstoffen nicht aktivierter NK-92/5.28.z ohne Antikörper ausgesetzt waren. Die CD163 Expression ähnelte der unbehandelten MDM, wohingegen CD80 verstärkt exprimiert wurde. Eine tendenzielle Zunahme der CD86 Expression konnte ebenfalls beobachtet werden, die sich allerdings von der auf unbehandelten MDM nur unwesentlich unterschied.

Die durch MDA-MB453 Tumorzellen vermittelte Aktivierung der NK-92/5.28.z Zellen verstärkte die beobachteten Unterschiede zwischen den Ansätzen deutlich. Die sekretierten Botenstoffe aktivierter NK-92/5.28.z Zellen polarisierten die Makrophagen hin zu einem M2-ähnlichen Phänotyp, angezeigt durch eine um 50% verringerte Expression der Oberflächenmarker CD86 und HLA-DR. Dies war auch in Anwesenheit des IgG4-Fc Kontroll-Proteins der Fall. Zudem wurde auf den MDM ein deutlicher Anstieg der Expression von CD163 und CD14 festgestellt, was repräsentativ für eine Polarisierung hin zu M2-Makrophagen ist. Außerdem steigerten mit Tumorzellen aktivierte NK-92/5.28.z Zellen allein und im Beisein des IgG4-Proteins die CD80 Expression auf den ko-kultivierten MDM. Wurden aktivierte NK-92/5.28.z in Gegenwart des anti-IL-10 Mini-Antikörpers kultiviert, wurde ebenfalls eine zu unbehandelten MDM verstärkte CD80 Expression beobachtet. Allerdings war diese im Vergleich zu aktivierten NK-92/5.28.z Zellen ohne Mini-Antikörper erniedrigt. Die sekretierten Faktoren aktivierter NK-92/5.28.z Zellen in Gegenwart des anti-IL-10 Mini-Antikörpers führten zu einer gesteigerten CD86

Expression, die ähnlich zu der mit IFN- γ und LPS behandelten MDM war. Auch die Expression des Markers HLA-DR war im Vergleich zu Proben ohne Mini-Antikörper erhöht und ähnelte der unbehandelten MDM. Weiterhin wurde der durch aktivierte NK-92/5.28.z Zellen verursachte Effekt auf die CD163 Expression durch die Zugabe des Mini-Antikörpers fast vollständig neutralisiert. So wurde CD163 in ähnlicher Menge exprimiert wie auf unbehandelten MDM. Zudem wurde CD14 deutlich niedriger exprimiert als auf MDM, die in Kontakt mit den Botenstoffen aktivierter NK-92/5.28.z Zellen ohne Antikörper waren. Insgesamt ist festzuhalten, dass die Neutralisierung von IL-10 durch den anti-IL-10 Mini-Antikörper der durch aktivierte NK-92/5.28.z Zellen induzierten Polarisierung in einen M2-ähnlichen Phänotyp entgegenwirkt und die Ausprägung eines M1-ähnlichen Phänotyps fördert.

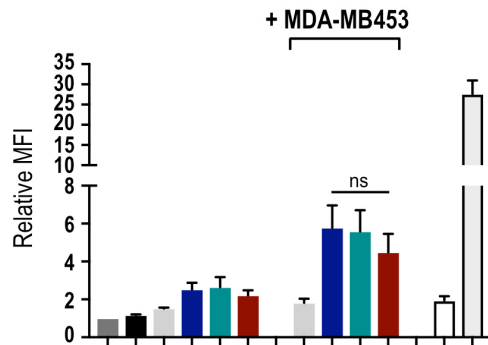
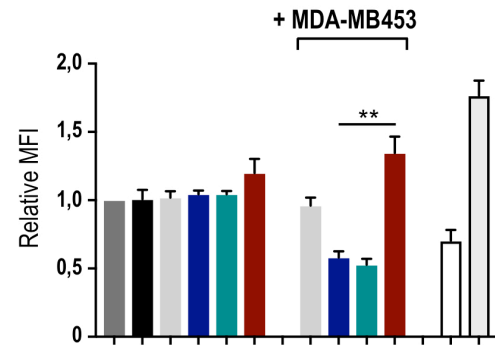
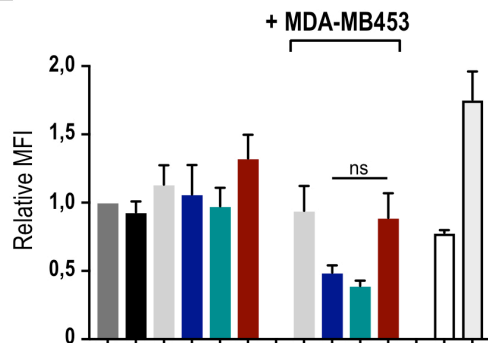
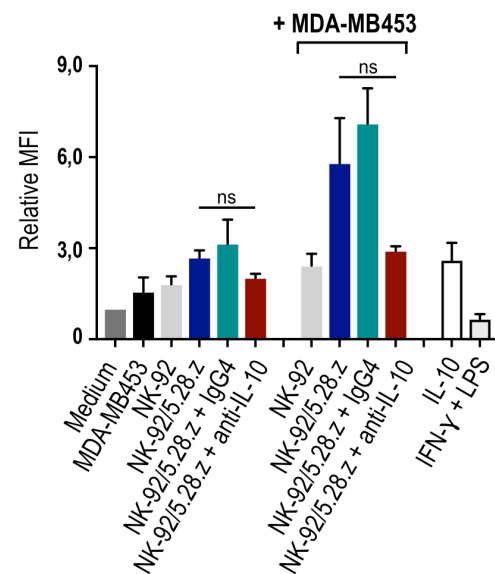
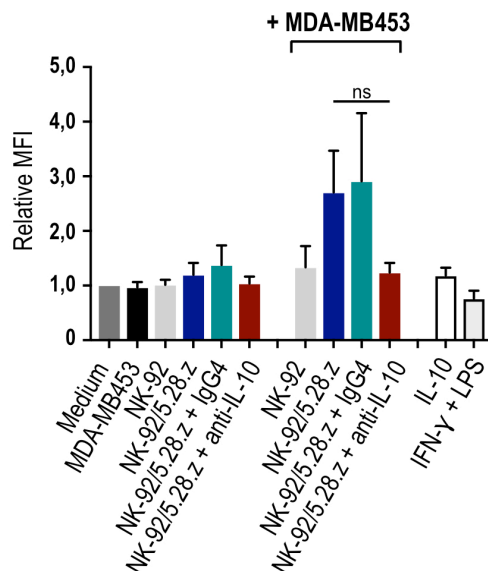
CD80**CD86****HLA-DR****CD14****CD163**

Abb. 4.25: Einfluss der von aktivierten NK-92/5.28.z Zellen sekretierten Faktoren auf die Polarisierung *in vitro* generierter Makrophagen. In eine 6-well Kulturplatte wurden MDM ausgesät, die durch einen Zellkultureinsatz von parentalen oder ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen in Ab- oder Anwesenheit von MDA-MB453 Tumorzellen getrennt wurden. Zudem wurden Ansätze mit anti-IL-10 Mini-Antikörper oder mit einem IgG4-Fc Kontroll-Protein versetzt, um den Einfluss der IL-10 Neutralisierung auf die Polarisierung von MDM zu untersuchen. MDM, die mit IFN- γ und LPS oder mit IL-10 behandelt wurden, dienten als Kontrollen für die Induzierung eines M1- oder M2-ähnlichen Phänotyps. Nach 48 h wurden die MDM geerntet und die Polarisierung der Zellen wurde anhand der Oberflächenexpression der Marker CD80, CD86, HLA-DR, CD14 und CD163 mittels Mehrfarben-Durchflusszytometrie analysiert. Für den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse wurden die MFI der untersuchten Marker behandelter MDM ins Verhältnis zu denen unbehandelter Zellen gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. MFI: *mean fluorescence intensity*. **: $p < 0,01$, ns: nicht signifikant.

4.5.3 Polarisierung von Makrophagen in Anwesenheit von α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen

Neben der Zugabe des anti-IL-10 Mini-Antikörpers wurde auch der Einfluss aktivierter, IL-10-depletierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen auf die Polarisierung von MDM untersucht. Das Experiment wurde ähnlich, wie unter 4.5.2 beschrieben, durchgeführt und ausgewertet. Parentale NK-92 Zellen und unmodifizierte oder α IL-10ER-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit ErbB2-überexprimierenden MDA-MB453 Zellen in den Zellkultureinsätzen ko-inkubiert. Weiterhin wurden NK-Zellen oder Tumorzellen allein als Kontrollen mitgeführt.

Die Behandlung mit IFN- γ und LPS induzierte wie zuvor einen M1-ähnlichen Phänotyp, der sich in einer erhöhten Expression von CD80, CD86 und HLA-DR, sowie in einer verminderten Expression der Marker CD14 und CD163 äußerte (Abb. 4.26). MDM, welche mit rekombinantem IL-10 behandelt waren, differenzierten auch hier in einen M2-ähnlichen Phänotyp, angezeigt durch eine verminderte Expression der Oberflächenmarker CD86 und HLA-DR und eine erhöhte Expression von CD14. Im Vergleich zu unbehandelten MDM wurde wie in 4.5.2 beschriebenen Versuch eine Zunahme der CD80 Expression nachgewiesen, die aber weniger ausgeprägt war als auf MDM, die mit IFN- γ und LPS behandelt waren. Die eigentlich zu erwartende Erhöhung der CD163 Expression wurde auch hier nicht beobachtet. So ähnelte die CD163 Expression IL-10 behandelter MDM der unbehandelten Makrophagen. Die in den Zellkultureinsätzen allein kultivierten MDA-MB453 Tumorzellen initiierten keine Polarisierung der durch die Membran getrennten MDM. So wurde die Expression der Marker CD80, CD86, HLA-DR und CD163 nicht beeinflusst. Allerdings wurde auch in diesem Experiment eine Zunahme der CD14 Expression beobachtet. Die von nicht aktivierten und mit Tumorzellen ko-kultivierten parentalen NK-92 Zellen sezernierten Botenstoffen führten zu einer Zunahme der CD80 und CD14 Expression auf den MDM, indessen entsprach die Expression von CD86 und HLA-DR der unbehandelten MDM. Die CD163 Expression blieb unbeeinflusst von nicht aktivierten parentalen NK-92 Zellen. Allerdings wurde eine im Vergleich zu unbehandelten MDM erhöhte CD163 Expression festgestellt, nachdem parentale NK-92 Zellen mit MDA-MB453 Zellen für 48 h ko-kultiviert wurden. So könnte die Zunahme der CD14 und CD163 Expression tendenziell für die Induktion eines M2-ähnlichen Phänotyps durch mit Tumorzellen ko-kultivierte parentale NK-92 Zellen sprechen. Die löslichen Faktoren nicht aktivierter NK-92/5.28.z Zellen beeinflussten die Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD163 auf den MDM, deren Expressionsniveau im Vergleich zu unbehandelten MDM deutlich erhöht war. So scheinen bereits die sezernierten Faktoren nicht aktivierter NK-92/5.28.z Zellen die Polarisierung der Makrophagen in einen M2-ähnlichen Phänotyp einzuleiten. Weiterhin wurde eine tendenzielle Abnahme der HLA-DR Expression beobachtet, die sich allerdings wie die CD86 Expression nur unwesentlich von der von unbehandelten

MDM unterschied. Daneben wurde eine Expressionssteigerung von CD80 nachgewiesen. Exprimierten nicht aktivierte NK-92/5.28.z Zellen den scFv-Antikörper α IL-10ER, so wurden die durch unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen ausgelösten Effekte partiell aufgehoben. Im Vergleich zu den löslichen Faktoren nicht aktivierter NK-92/5.28.z Zellen führten die sekretierten Botenstoffe nicht aktivierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen zu einer Zunahme der CD86 und HLA-DR Expression auf den MDM. Zudem wurden die Marker CD163 und CD14 deutlich niedriger exprimiert als auf MDM, die den sekretierten Faktoren nicht aktivierter NK-92/5.28.z Zellen ausgesetzt waren. Dabei unterschied sich die CD163 Expression kaum von der unbehandelten MDM. Zwar wurde durch NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen eine zu unbehandelten MDM verstärkte CD80 Expression induziert, allerdings war diese im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28.z erniedrigt. Dies lässt den Schluss zu, dass die durch nicht aktivierte NK-92/5.28.z ausgeübten Effekte zu einem großen Teil auf die IL-10 Sekretion zurückzuführen sind, da die Hemmung der IL-10 Produktion in NK-92/5.28.z Zellen durch die Expression des α IL-10ER-Antikörpers den Einfluss auf die Markerexpression abschwächte oder umkehrte.

Die beobachteten Unterschiede zwischen den Ansätzen wurden durch die von MDA-MB453 Tumorzellen vermittelte Aktivierung der NK-92/5.28.z Zellen zusätzlich verstärkt. Die löslichen Faktoren mit Tumorzellen aktivierter NK-92/5.28.z Zellen induzierten wie im vorangegangenen Experiment (siehe 4.5.2) einen M2-ähnlichen Phänotyp der MDM, welcher sich durch eine um 40% verringerte Expression der Oberflächenmarker CD86 und HLA-DR im Vergleich zu unbehandelten MDM äußerte. Zudem war die Expression der Marker CD14 und CD163 deutlich erhöht. Weiterhin wurde CD80 verstärkt auf den MDM exprimiert. Auch die löslichen Faktoren aktivierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen führten zu einer im Vergleich zu unbehandelten MDM verstärkten CD80 Expression, allerdings war diese im Vergleich zu NK-92/5.28.z Zellen ohne Antikörperexpression erniedrigt. Ähnliches wurde bereits im vorherigen Experiment nach Zugabe des anti-IL-10 Mini-Antikörpers beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass die IL-10 Sekretion nicht aktivierter und mit Tumorzellen aktivierter, unmodifizierter NK-92/5.28.z Zellen an der Zunahme der CD80 Expression auf MDM beteiligt ist. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Behandlung von MDM mit IL-10 allein ebenfalls zu einer Zunahme der CD80 Expression führte. Durch die reduzierte IL-10 Sekretion aktivierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen wurde die CD86 und HLA-DR Expression deutlich gesteigert, welche damit ähnlich der mit IFN- γ und LPS behandelten MDM war. Dies bestätigt, dass IL-10 in der Tat den von aktivierten NK-92 Zellen sezernierten pro-inflammatorischen Faktoren entgegenwirkt und eine IL-10 Depletion dies aufhebt. Weiterhin wurden die Marker CD14 und CD163 deutlich niedriger exprimiert als auf MDM, die den Botenstoffen aktivierter NK-92/5.28.z Zellen ohne α IL-10ER-Antikörperexpression ausgesetzt waren. Somit wirkt die Reduktion der IL-10 Sekretion der Polarisierung in einen M2-ähnlichen

Phänotyp entgegen und fördert die Induktion eines M1-ähnlichen Phänotyps. Damit unterstützen die hier erhobenen Daten die mit dem anti-IL-10 Mini-Antikörper gewonnenen Erkenntnisse.

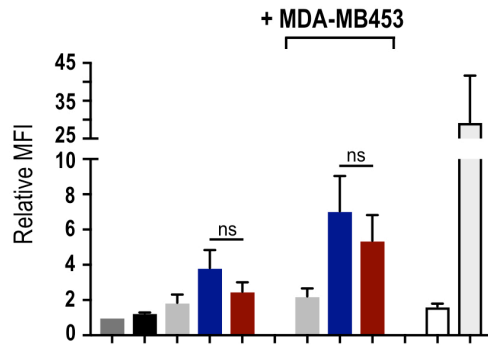
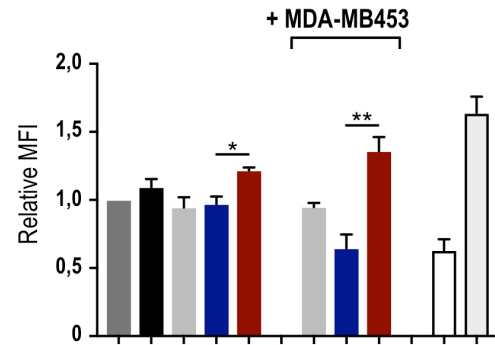
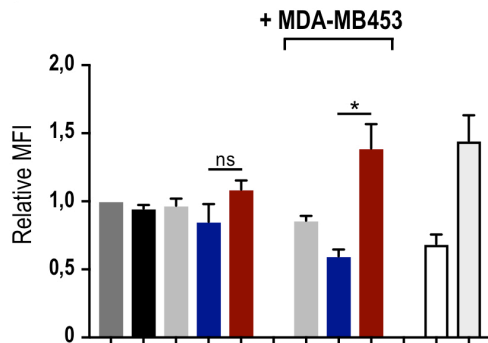
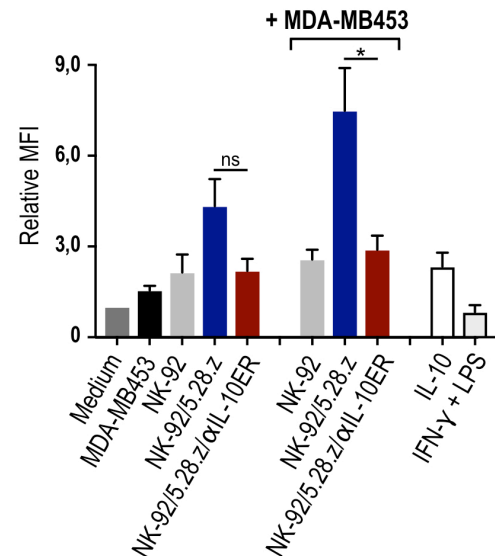
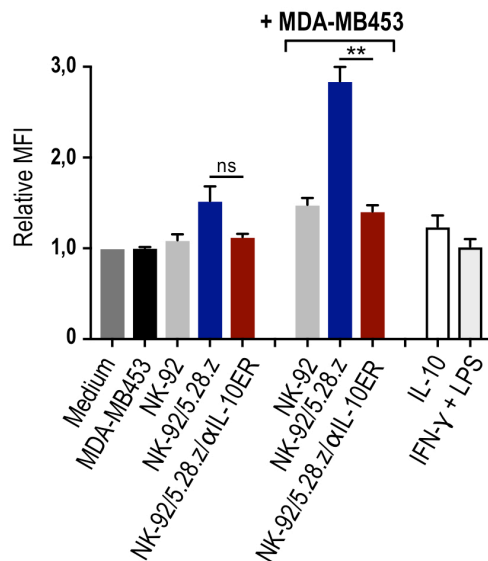
CD80**CD86****HLA-DR****CD14****CD163**

Abb. 4.26: Einfluss der von aktivierten NK-92/5.28.z/αIL-10ER Zellen sekretierten Faktoren auf die Polarisierung *in vitro* generierter Makrophagen. In eine 6-well Kulturplatte wurden MDM ausgesät, die durch einen Zellkultureinsatz von parentalen oder ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen in Ab- oder Anwesenheit von MDA-MB453 Tumorzellen getrennt wurden. Zudem wurden Ansätze mit IL-10-depletierten NK-92/5.28.z/αIL-10ER Zellen mitgeführt, um den Einfluss einer verminderten IL-10 Sekretion auf die Polarisierung der MDM zu untersuchen. MDM, die mit IFN-γ und LPS oder mit IL-10 behandelt wurden, dienten als Kontrollen für die Induzierung eines M1- oder M2-ähnlichen Phänotyps. Nach 48 h wurden die MDM geerntet und die Polarisierung der Zellen wurde anhand der Oberflächenexpression der Marker CD80, CD86, HLA-DR, CD14 und CD163 mittels Mehrfarben-Durchflusszytometrie analysiert. Für den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse wurden die MFI der untersuchten Marker behandelter MDM ins Verhältnis zu denen unbehandelter Zellen gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. MFI: *mean fluorescence intensity*. **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, ns: nicht signifikant.

4.5.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.5.1 bis 4.5.3

In den hier beschriebenen Experimenten wurde beobachtet, dass die löslichen Faktoren der mit MDA-MB453 Tumorzellen aktivierten NK-92/5.28.z Zellen die Reifung dendritischer Zellen einleiteten und dieser Prozess durch die IL-10 Depletion in α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen gefördert wurde. Zudem zeigte sich, dass die sekretierten Botenstoffe aktivierter NK-92/5.28.z Zellen die Polarisierung von Makrophagen in einen M2-ähnlichen Phänotyp induzierten. Wurde die Aktivität des von NK-92/5.28.z Zellen sekretierten IL-10 durch Zugabe des anti-IL-10 Mini-Antikörpers neutralisiert oder die Sekretion von IL-10 in NK-92/5.28.z Zellen durch die intrazelluläre Expression des α IL-10ER-Antikörpers unterbunden, wirkte dies der Polarisierung in den M2-Phänotyp entgegen und begünstigte die Ausprägung eines M1-ähnlichen Phänotyps. Die erhaltenen Daten bestätigen somit einen wichtigen Einfluss des von aktivierten CAR NK-92 Zellen sezernierten IL-10 auf den Phänotyp umgebender Antigen-präsentierender Zellen.

4.6 *In vivo* Anti-Tumor-Aktivität α IL-10ER-exprimierender NK-92/5.28.z Zellen in einem immunkompetenten Mausmodell

Da es nicht möglich ist, die komplexen Vorgänge in lebenden Organismen vollständig *in vitro* nachzubilden, wurde in einem geeigneten Mausmodell untersucht, ob die Hemmung der IL-10 Sekretion in NK-92/5.28.z Zellen einen Einfluss auf die Anti-Tumor-Aktivität dieser Zellen *in vivo* ausübt. In früheren Arbeiten der Gruppe wurde die antitumorale Aktivität der NK-92/5.28.z Zellen bereits in einem immunkompetenten Modell gezeigt (Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2017). Dabei wurde die Mehrzahl immunkompetenter C57BL/6 Mäuse mit syngenem ErbB2-exprimierenden GL261-Gliomen durch die lokale Behandlung mit NK-92/5.28.z Zellen geheilt. Außerdem wurde ein immunologischer Langzeitschutz gegen die Ausbildung neuer Tumoren in diesen Tieren induziert. Um den Einfluss der IL-10 Depletion auf die Anti-Tumor-Aktivität der NK-92/5.28.z Zellen und eine mögliche, durch die Behandlung induzierte endogene Anti-Tumor-Immunantwort zu analysieren, wurde in dieser Arbeit ein ähnliches immunkompetentes Mausmodell mit syngenem B16-F10 Zellen etabliert.

Hierzu wurde die von der Arbeitsgruppe um Kershaw und Darcy (Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellte murine Melanom-Zelllinie B16-F10/ErbB2 (Pegram et al., 2008) eingesetzt, die nach retroviralem Transfer das humane Antigen ErbB2 stabil exprimiert. Vor dem Einsatz der Zellen *in vivo* wurden zunächst *in vitro* Experimente durchgeführt, um die Sensitivität der Melanomzellen gegenüber NK-92/5.28.z Zellen zu testen (Abb. 4.27).

Zunächst wurde die ErbB2-Expression in B16-F10/ErbB2 Tumorzellen in einer durchflusszytometrischen Analyse mit einem ErbB2-spezifischen Antikörper überprüft (Abb. 4.27 A, oben). Es zeigte sich, dass B16-F10/ErbB2 Zellen ErbB2 stark exprimierten, wohingegen auf parental B16-F10 Tumorzellen keine ErbB2-Expression festgestellt wurde. Nachfolgend

wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen mit NK-92/5.28.z und NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen durchgeführt (Abb. 4.27 B). Parentale B16-F10 Melanomzellen wurden dabei in 2 h Zytotoxizitätsassays nur in sehr geringem Ausmaß von parentalen NK-92 und zielgerichteten NK-92/5.28.z Zellen mit unveränderter oder modifizierter IL-10 Sekretion abgetötet. ErbB2-überexprimierende B16-F10/ErbB2 Zellen wurden hingegen bei allen E/T-Verhältnissen durch ErbB2-spezifische NK-92/5.28.z und NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen lysiert, wobei kein signifikanter Unterschied in der Lyse-Aktivität der beiden CAR-exprimierenden Effektorzelllinien festzustellen war. Zudem wurde untersucht, in welchem Ausmaß die Zytokine IL-10, IFN- γ , MIP-1 α und TNF- α von unmodifizierten und α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen nach Kontakt mit B16-F10/ErbB2 Tumorzellen freigesetzt werden (Abb. 4.27 C). Hierfür wurden NK-92/5.28.z Zellen mit der gleichen Anzahl an B16-F10/ErbB2 Melanomzellen für 6 h ko-inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und mit Hilfe eines *Cytometric Bead Array* auf das Vorhandensein der oben genannten Zytokine hin analysiert. Für unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen im nicht aktivierten Zustand wurde eine IL-10 Konzentration von 0,72 ng/ml ermittelt. Nach Aktivierung der NK-Zellen mit der Tumorzelllinie B16-F10/ErbB2 erhöhte sich die IL-10 Konzentration im Überstand auf 5,0 ng/ml. Im Vergleich dazu war die IL-10 Ausschüttung α IL-10ER-exprimierender NK-92/5.28.z Zellen sowohl im nicht aktivierten (0,07 ng/ml) als auch im aktivierten Zustand (0,14 ng/ml) um 97% reduziert.

Die verminderte IL-10 Sekretion hatte keinen Einfluss auf die Ausschüttung der Zytokine IFN- γ und MIP-1 α nicht aktivierter oder aktivierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen. Die im Zellkulturüberstand gemessenen Konzentrationen entsprachen im Wesentlichen denen bei NK-92/5.28.z Zellen mit unmodifizierter IL-10 Sekretion (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde ein Unterschied in der TNF- α Sekretion beobachtet. Die Stimulierung von NK-92/5.28.z Zellen mit B16-F10/ErbB2 Zellen führte zu einer TNF- α Konzentration im Überstand von 0,04 ng/ml. Im Fall von NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen wurde dagegen nach Aktivierung eine TNF- α Konzentration von 0,15 ng/ml gemessen. Dies bestätigt vorherige Daten mit MDA-MB453 Zielzellen, bei denen ebenfalls eine erhöhte TNF- α Ausschüttung IL-10-depletierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen beobachtet wurde (Abb. 4.21).

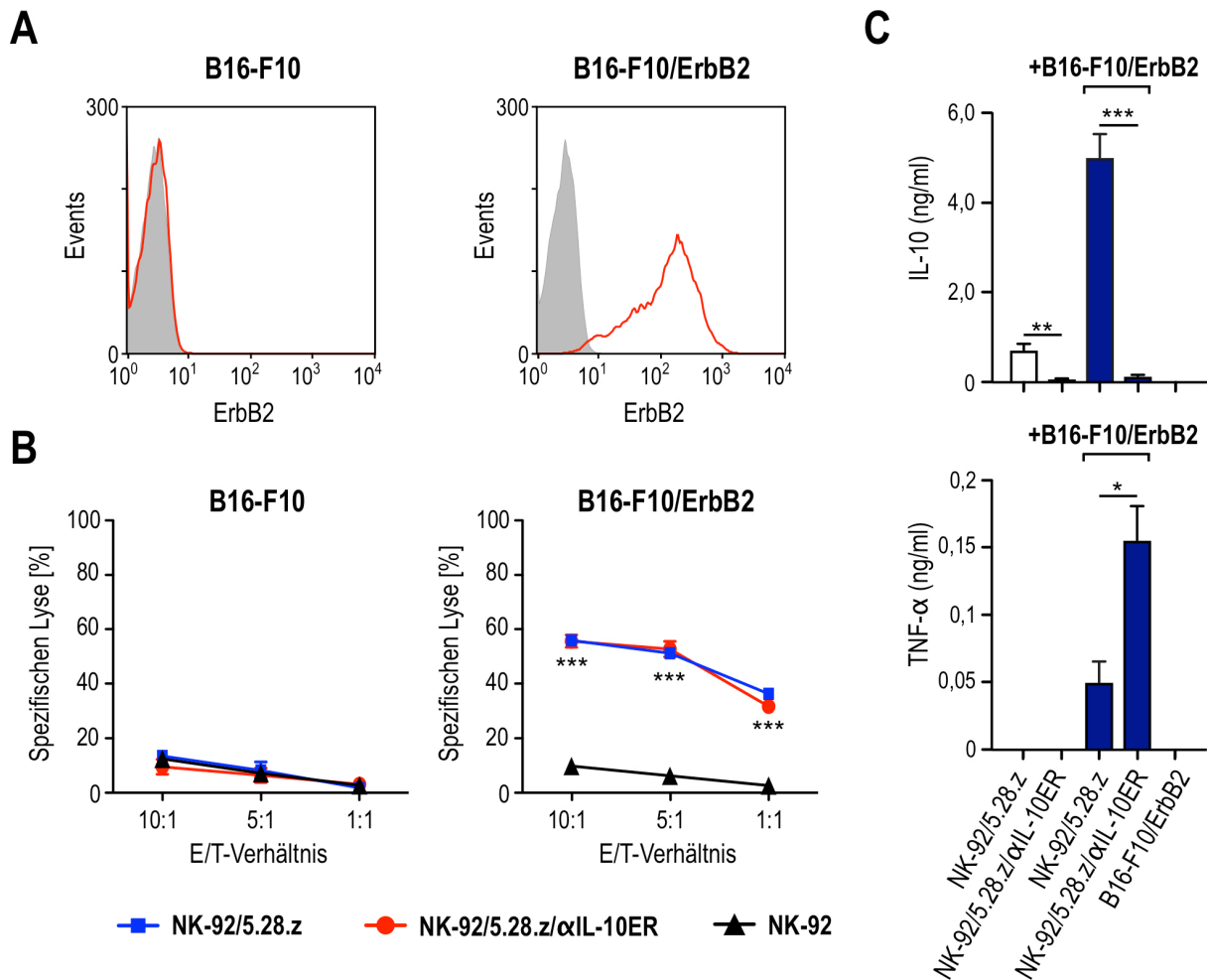


Abb. 4.27: ErbB2-Expression der Melanomzelllinie B16-F10/ErbB2 und Sensitivität gegenüber ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen. (A) Analyse der ErbB2-Expression in parentalen und retroviral transduzierten B16-F10 Zellen. Die ErbB2-Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch mit einem direkt gekoppelten anti-ErbB2-AF647 Antikörper detektiert (rote Linie). Als Kontrolle wurden Tumorzellen mit einem direkt gekoppelten, irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps gefärbt (graue Fläche). **(B) Sensitivität gegenüber CAR NK-92 Zellen.** Die spezifische Lyse der Melanomzellen durch parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen wurde nach zweistündiger Ko-Inkubation durchflusszytometrisch analysiert. Von den erhaltenen Werten wurde die Prozentzahl der spontanen Lyse nach Inkubation der Tumorzellen ohne NK-Zellen subtrahiert. **(C) Analyse der IL-10 und TNF-α Sekretion ErbB2-spezifischer CAR NK-92 Zellen nach Kontakt mit ErbB2-exprimierenden B16-F10 Melanomzellen.** NK-92/5.28.z Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit ErbB2-positiven B16-F10 Tumorzellen für 6 h bei 37°C ko-inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-10 und TNF-α in den Zellkulturüberständen mittels *Cytometric Bead Array* bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,5$.

Nachfolgend wurde der Anti-Tumor-Effekt der NK-92/5.28.z Zellen *in vivo* im immunkompetenten Mausmodell untersucht (Abb. 4.28). Hier stellte sich die Frage, ob die therapeutische Wirksamkeit dieser Zellen durch die Modifikation der IL-10 Sekretion beeinflusst wird. Fünf weibliche C57BL/6N Albino Mäuse je Gruppe wurden subkutan mit B16-F10/ErbB2 Zellen inokuliert (Abb. 4.28 A). Eine Woche später erfolgte nach Etablierung der subkutanen Tumoren eine Behandlung mit parentalen oder ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen mittels peritumoraler Injektion. Eine Injektion von DPBS diente als Kontrolle. Die

Behandlung wurde zweimal wöchentlich für insgesamt drei Wochen durchgeführt. Die Tumorgroße wurde regelmäßig mit Hilfe einer Schieblehre ermittelt.

Das mittlere Überleben (Median) der C57BL/6N Albino Mäuse mit B16-F10/ErbB2 Tumoren betrug nach Behandlung mit DPBS oder parentalen NK-92 Zellen 24 bzw. 20 Tage (Abb. 4.28 B). Hierbei ist anzumerken, dass die Mehrzahl der so behandelten Mäuse bereits vor dem Behandlungsende an Tag 24 aufgrund des Erreichens der gewählten Abbruchkriterien getötet werden musste. Im Vergleich dazu hatten Tiere, die mit NK-92/5.28.z oder NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen behandelt wurden, einen Überlebensvorteil. So wurde durch die NK-92/5.28.z Zellen das mittlere Überleben auf 34 Tage und durch NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen auf 38 Tage verlängert. Damit konnte die Anti-Tumor-Aktivität der ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen auch *in vivo* nachgewiesen werden. Ein Tier der mit NK-92/5.28.z Zellen behandelten Gruppe überlebte sogar bis Versuchstag 59. Allerdings wurde keines der behandelten Tiere durch die Injektion von CAR NK-92 Zellen geheilt. Zudem waren die Überlebenskurven der mit NK-92/5.28.z und NK-92/5.28.z/ α IL-10ER therapierten Behandlungsgruppen nicht signifikant verschieden. Somit ist festzuhalten, dass die Hemmung der IL-10 Sekretion in NK-92/5.28.z Zellen in diesem Modell keinen Einfluss auf den Therapieerfolg der Zellen hatte. Da aber auch kein schnelleres Tumorwachstum und damit einhergehend eine verkürzte Überlebenszeit der Tiere nach Behandlung mit IL-10-depletierten NK-92/5.28.z Zellen beobachtet wurde, können nennenswerte IL-10-vermittelte Beiträge zur Tumorregression ausgeschlossen werden.

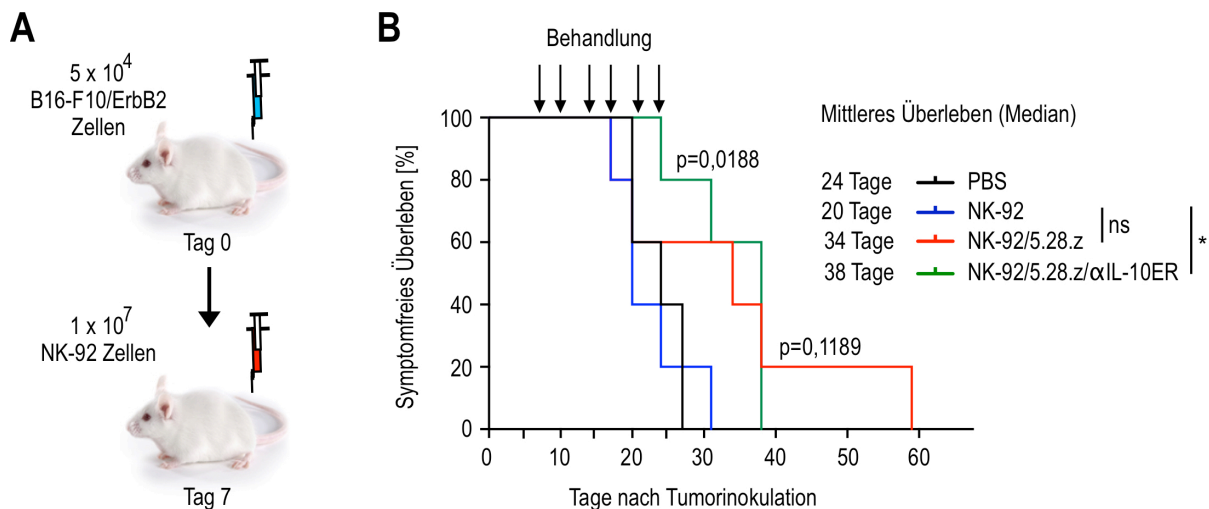


Abb. 4.28: Peritumorale Behandlung von subkutanen B16-F10/ErbB2 Melanomen in C57BL/6N Albino Mäusen mit parentalen oder ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen. (A) Durchführung des *in vivo* Versuchs. 5 x 10⁴ B16-F10/ErbB2 Melanomzellen wurden subkutan in die rechte Flanke von weiblichen C57BL/6N Albino Mäusen verabreicht. Nach sieben Tagen folgte die erste Behandlung mit 1 x 10⁷ parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen, welche peritumoral injiziert wurden. Die Behandlung wurde zweimal wöchentlich für einen Zeitraum von 3 Wochen durchgeführt. Als Kontrolle wurden Mäuse mit zellfreiem Injektionsmedium (1x DPBS) behandelt. **(B) Kaplan-Meier Kurve.** Gezeigt ist das symptomfreie Überleben der behandelten C57BL/6N Albino Mäuse. Mäuse, deren Tumor einen Durchmesser von annähernd 1,5 cm erreichte, wurden vorzeitig unter Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet, um ein unnötiges Leiden der Tiere zu vermeiden. Pro Gruppe wurden jeweils fünf Mäuse behandelt. *: p < 0,05.

Aktivierte CAR NK-92 Zellen sekretieren große Mengen an IFN- γ (Schonfeld et al., 2015). Allerdings ist aus der Literatur bekannt, dass das humane IFN- γ auf murinen Zellen keine Wirkung hat (Aguet et al., 1988; Schroder et al., 2004). Dies könnte die Induktion einer endogenen Immunantwort gegen B16-F10/ErbB2 nach Therapie mit CAR NK-92 Zellen beeinflussen. IFN- γ ist an einer Vielzahl immunologischer Reaktionen in der Tumormikroumgebung und vor allem für die Ausbildung der Effektorfunktion Antigen-spezifischer T-Zellen wichtig (siehe Einleitung 1.3.3). Zudem bewirkt es eine verstärkte Bildung von MHC-Klasse I Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen und kann somit die Tumorzellerkennung durch CD8⁺ T-Zellen fördern (Garrido et al., 2016; Seliger and Pfizenmaier, 1989; Vegh et al., 1993). Tumorzellen regulieren ihre MHC-Klasse I Expression oft herunter und entgehen so dem Angriff zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen. Um in einem *in vitro* Experiment zu überprüfen, ob das auch für B16-F10/ErbB2 Tumorzellen der Fall ist, wurden diese auf ihre MHC-Klasse I Expression hin analysiert. Weiterhin wurde untersucht, ob die Behandlung der Tumorzellen mit murinem oder humanem IFN- γ eine Steigerung der MHC-Klasse I Expression initiiert. Dazu wurden B16-F10/ErbB2 Tumorzellen in Wachstumsmedium in eine 6-well Kulturplatte ausgesät. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit murinem oder humanem IFN- γ . Um die basale Expression von MHC-Klasse I Molekülen zu bestimmen, wurden nicht-behandelte Tumorzellen mitgeführt. Nach 48 h wurden die B16-F10/ErbB2

Tumorzellen geerntet und mittels Durchflusszytometrie auf die Oberflächenexpression von MHC-Klasse I hin untersucht (Abb. 4.29).

Es zeigte sich, dass auf unbehandelten B16-F10/ErbB2 Tumorzellen keine MHC-Klasse I Expression nachweisbar war (Abb. 4.29 rote Linie). Auch nach Behandlung mit humanem IFN- γ wurden keine MHC-Klasse I Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen detektiert. Erst die Stimulierung mit murinem IFN- γ induzierte eine starke Expression von MHC-Klasse I Molekülen auf B16-F10/ErbB2 Tumorzellen.

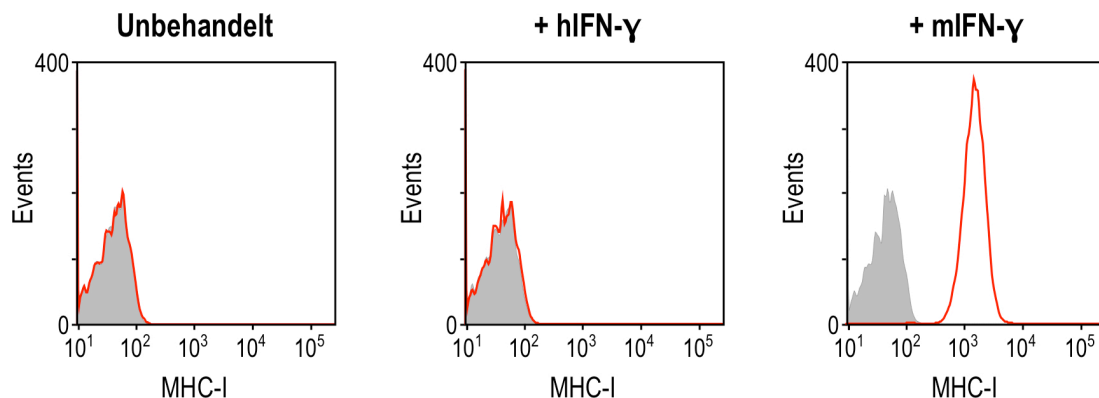


Abb. 4.29: MHC-Klasse I Expression auf B16-F10/ErbB2 Tumorzellen. 2×10^5 B16-F10/ErbB2 Tumorzellen wurden in 2 ml Wachstumsmedium in eine 6-Well Kulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden für 48 h mit 20 ng/ml humanem (hIFN- γ) oder murinem IFN- γ (mIFN- γ) behandelt. Um die basale Expression von MHC-Klasse I auf der Oberfläche von B16-F10/ErbB2 Zellen zu untersuchen, wurden unbehandelte Tumorzellen mitgeführt. Die MHC-Klasse I-Oberflächenexpression wurde mit Hilfe eines APC-gekoppelten H-2D^b-Antikörpers mittels Durchflusszytometrie ermittelt (rote Linie). Zur Kontrolle wurden Tumorzellen mit einem irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps gefärbt (graue Fläche).

Die erhaltenen Daten legen nahe, dass B16-F10/ErbB2 Tumorzellen durch die Herunterregulation der MHC-Klasse I Moleküle in der Tat der Erkennung und Eliminierung durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen entgehen könnten. Da *in vitro* bestätigt werden konnte, dass humanes IFN- γ keine Wirkung auf diese murinen Tumorzellen hat, ist anzunehmen, dass auch das durch NK-92/5.28.z Zellen ausgeschüttete IFN- γ *in vivo* keinen Einfluss auf die murinen Tumor- und umgebenden Immunzellen ausübt. Obwohl IL-10 pro-inflammatorischen Faktoren entgegenwirkt, kann die Hemmung seiner Sekretion in NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen, aufgrund der fehlenden Aktivität des ausgeschütteten humanen IFN- γ , möglicherweise keinen entscheidenden Beitrag zur Induktion einer endogenen Anti-Tumor-Immunantwort leisten.

Zusammenfassung des Abschnitts 4.6

Murine B16-F10/ErbB2 Melanom-Zellen, die humanes ErbB2 stabil exprimieren, wurden von ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen *in vitro* effektiv lysiert. Parentale NK-92 Zellen waren dagegen nicht imstande, die Zielzellen abzutöten. Weiterhin wurde gezeigt, dass NK-92/5.28.z Zellen nach Kontakt mit B16-F10/ErbB2 immunmodulatorische Zytokine wie TNF- α und IL-10 sekretierten. Die Expression des α IL-10ER-Antikörpers in NK-92/5.28.z Zellen führte dagegen

auch hier zu einer 97%igen Reduktion der IL-10 Ausschüttung im Vergleich zu unmodifizierten Zellen. Hingegen war die TNF- α Ausschüttung nach Hemmung von IL-10 signifikant gesteigert. In einem immunkompetenten Mausmodell mit subkutan verabreichten B16-F10/ErbB2 Tumorzellen führte die Behandlung Tumor tragender Mäuse mit NK-92/5.28.z oder NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen zu einem Überlebensvorteil im Vergleich zu Tieren, die mit parentalen NK-92 Zellen oder DPBS behandelt wurden. Allerdings wurde nach Behandlung mit unmodifizierten oder IL-10-depletierten NK-92/5.28.z Zellen kein wesentlicher Unterschied im Überleben der Tiere festgestellt. In einem davon unabhängig durchgeführten *in vitro* Experiment wurde gezeigt, dass B16-F10/ErbB2 Tumorzellen keine MHC-Klasse I Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, die Expression von MHC-Klasse I jedoch durch die Behandlung mit murinem IFN- γ induziert werden konnte. Humanes IFN- γ hatte dagegen keine Wirkung. Dies lässt darauf schließen, dass auch das von NK-92/5.28.z Zellen ausgeschüttete IFN- γ *in vivo* keinen Einfluss auf murine Tumor- und Immunzellen ausübt. Entsprechend ist es in diesem Modell nicht möglich, die Effekte des von CAR NK-92 Zellen ausgeschütteten IFN- γ auf die endogene Immunantwort durch eine Hemmung der IL-10 Sekretion zu verstärken.

5 Diskussion

NK-Zellen sind ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie spielen bei der Eliminierung maligner Zellen eine wichtige Rolle und sind in der Regulierung einer Tumorspezifischen adaptiven Immunantwort involviert. NK-Zellen werden als Effektorzelltyp in der adoptiven Krebs-Immuntherapie eingesetzt. Als allogenes Zelltherapeutikum kommt neben primären Spender-NK-Zellen auch die humane NK-Zelllinie NK-92 zum Einsatz. NK-92 Zellen weisen eine hohe antitumorale Aktivität auf, allerdings ist ihre Zytotoxizität gegenüber Krebszellen von soliden Tumoren beschränkt. Daher wurden in dieser und anderen Arbeitsgruppen genmodifizierte NK-92 Zellen generiert, die nach viralem Gentransfer chimäre Antigenrezeptoren (CARs) exprimieren, welche definierte Antigene auf der Oberfläche von Tumorzellen erkennen und somit Antigen-positive Zellen solider Tumoren effizient abtöten können (zusammengefasst in Zhang et al., 2017). Die in dieser Arbeitsgruppe entwickelte CAR NK-92 Zelllinie NK-92/5.28.z erkennt das Tumor-assoziierte Antigen ErbB2 und führte in präklinischen Tierexperimenten zur Abstoßung ErbB2-exprimierender Tumoren (Schonfeld et al., 2015; Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2017). Zudem induzierte die Behandlung mit ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen in immunkompetenten Tieren einen immunologischen Langzeitschutz gegen das Auswachsen erneut injizierter Tumorzellen. Eine mögliche Erklärung für die Modulation der endogenen Anti-Tumor-Immunantwort ist die Sekretion proinflammatorischer Zytokine aktivierter CAR NK-Zellen, die die Aktivität von Immunzellen in der Tumor-Mikroumgebung beeinflussen. *In vitro* Experimente zeigten, dass CAR NK-92 Zellen nach Kontakt mit Antigen-positiven Tumorzellen große Mengen proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ , in den Kulturüberstand sekretieren. (Genssler et al., 2016; Oelsner et al., 2017; Schonfeld et al., 2015). Allerdings sezernieren aktivierte CAR NK-92 Zellen auch das immunregulatorische Zytokin IL-10 in hohen Mengen, das grundsätzlich proinflammatorischen Faktoren entgegenwirken und die endogene Anti-Tumor-Antwort dämpfen, aber auch die Zytotoxizität von T-Zellen und NK-Zellen steigern kann (Emmerich et al., 2012; Mittal and Roche, 2015; Mocellin et al., 2004b). Auf Grundlage der derzeitigen Literatur ist die Bedeutung des durch NK-Zellen sekretierten IL-10 für NK-Zellen selbst und für umgebende Immunzellen bisher noch nicht eindeutig geklärt.

Entsprechend war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von IL-10 auf das Wachstum und die Funktion von NK-Zellen zu untersuchen, sowie die Bedeutung des von NK-Zellen sekretierten IL-10 für die Interaktion mit anderen Immunzellen zu verstehen. Unter Nutzung der humanen NK-Zelllinie NK-92 und der CAR Effektorzelllinie NK-92/5.28.z als klinisch relevante Modelle wurden Ansätze untersucht, die das von den NK-Zellen sezernierte IL-10 in seiner Produktion und biologischen Aktivität inhibieren. Die damit verbundenen Effekte auf das Wachstum und die Funktionalität von parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen wurden ebenso analysiert, wie die Auswirkung auf die Reifung und Polarisierung *in vitro* generierter

dendritischer Zellen und Makrophagen. Schließlich wurde in einem immunkompetenten Mausmodell mit einem syngenem, ErbB2-exprimierenden Melanom die *in vivo* Anti-Tumor-Aktivität IL-10-depletierter NK-92/5.28.z Zellen im Vergleich zu unveränderten CAR NK-92 Zellen getestet.

5.1 Expression von IL-10 und IL-10R in parentalen und ErbB2-spezifischen NK-92 Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Aktivierungs-induzierte Expression von IL-10 in parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen bestätigt (Abb. 4.1). So zeigte sich in den durchgeführten CBA-, mRNA- und Immunoblot-Analysen eine Erhöhung der IL-10 mRNA- und Protein-Expression nach Aktivierung der parentalen NK-92 oder CAR NK-92/5.28.z Zellen mit Tumorzellen oder PMA und Ionomycin. Dabei exprimierten aktivierte NK-92/5.28.z Zellen deutlich mehr IL-10 als parentale NK-92 Zellen, was die Ergebnisse einer anderen Arbeit bestätigte (Nowakowska et al., 2018). Die erhöhte IL-10 Expression von CAR NK-92 Zellen ist möglicherweise auf die im CAR vorhandene zusätzliche kostimulatorische Domäne CD28 zurückzuführen, die die Signale der CD3 ζ Kette weiter verstärkt. Exprimierten T-Zellen anstelle von CARs der 1. Generation CAR-Moleküle der 2. Generation mit CD28 als kostimulatorischer Domäne, führte dies zu einer gesteigerten Proliferation, Zytotoxizität und IFN- γ Sekretion (Hombach and Abken, 2007). Auch IL-10 wurde in höheren Mengen von diesen CAR-T-Zellen ausgeschüttet. Eine erhöhte IL-10 Konzentration wurde auch im Serum von Patienten nachgewiesen, denen zur Behandlung von Tumorerkrankungen CAR-T-Zellen verabreicht wurden (Magee and Snook, 2014). IL-10 ist als ein Zytokin mit pleiotropen Effekten definiert, das von diversen Immunzellen ausgeschüttet wird (Asadullah et al., 2003). So wurde beispielsweise eine hohe Aktivierungs-induzierte IL-10 Expression in Zytokin-stimulierten primären NK-Zellen nachgewiesen (Mehrotra et al., 1998). Eine verstärkte IL-10 Sekretion wurde vor allem für immunsupprimierende Immunzellen, wie Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) mit M2-Eigenschaften, Tregs und MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) beschrieben (Beury et al., 2014; Gabrilovich et al., 2012; Kerkar and Restifo, 2012). IL-10 beeinträchtigt die adaptive Immunität durch die Inhibierung Antigen-präsentierender Zellen, wie DCs und Makrophagen (Mittal and Roche, 2015; Sato et al., 2011). So blockiert IL-10 die MyD88-abhängige TLR Signalweiterleitung, verhindert die Differenzierung von Monozyten in DCs und hemmt sogar die Reifung von DCs, die für die Ausbildung der Effektorfunktionen Antigen-spezifischer T-Zellen unerlässlich sind (Allavena et al., 1998; Banchereau et al., 2000; Corinti et al., 2001). Weiterhin induziert IL-10 die Polarisierung von Makrophagen in einen M2-ähnlichen Phänotyp, der zur Tumorprogression beitragen kann (Quatromoni and Eruslanov, 2012). Daneben inhibiert IL-10 die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen (Del Prete et al., 1993; Hsu et al., 1992). In weiteren Studien wurde

nachgewiesen, dass IL-10 direkt auf Tumor-spezifische CD8⁺ T-Zellen wirkt und diese in ihrer Proliferation und ihrem Überleben beeinträchtigt (Sun et al., 2015), sowie die Sensitivität von CD8⁺ T-Zellen gegenüber Antigenen über die Modifikation der Zelloberflächen-Glykosylierung vermindert (Smith et al., 2018).

Neben immunsupprimierenden Effekten wurden allerdings auch immunstimulierende Eigenschaften für IL-10 beschrieben. So ist IL-10 in der Lage, die Zytotoxizität, Proliferation und IFN- γ Expression von CD8⁺ T-Zellen und die Zytotoxizität von NK-Zellen zu steigern (Groux et al., 1998; Mocellin et al., 2004a; Mumm et al., 2011). In präklinischen Tiermodellen förderte IL-10 die Tumorregression, was auf eine IL-10-vermittelte Expansion und Aktivierung von CD8⁺ Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten zurückgeführt wurde (Emmerich et al., 2012; Mumm et al., 2011). Basierend auf diesen präklinischen Ergebnissen wurde eine pegylierte Form von IL-10 in einer klinischen Phase-I-Studie (NCT02009449) zur Behandlung von soliden Tumoren getestet. Die Anwendung von pegyliertem IL-10 erwies sich dabei als sicher und induzierte in einer Vielzahl von Patienten eine Anti-Tumor-Immunantwort (Naing et al., 2016). So wurde in den Seren der Patienten eine durch IL-10 induzierte Konzentrationssteigerung von IFN- γ und IL-18 nachgewiesen, die repräsentativ für eine Th1-Immunantwort sind. Zudem wurde eine verminderte Konzentration des immunsupprimierenden Zytokins TGF- β gemessen, und vor allem in Patienten mit Nierenzellkarzinom eine Tumorregression beobachtet. In einer weiteren Studie steigerte die Gabe von pegyliertem IL-10 in Kombination mit dem *Checkpoint*-Inhibitor Nivolumab (anti-PD1) die objektive Ansprechrate (*objective response rate*, ORR) von Patienten mit Nierenzellkarzinom noch weiter (Naing et al., 2017). Ähnliches wurde bei Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs beobachtet (Papadopoulos et al., 2016). Die Kombinationstherapie bestehend aus pegyliertem IL-10 und den Chemotherapeutika FOLFOX (Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin) wird gegenwärtig in einer größeren Kohorte von Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs in einer Phase-III-klinischen Studie getestet (NCT02923921). Eine Erklärung für die in der Literatur beschriebenen gegensätzlichen Aktivitäten von IL-10 könnte neben dem jeweiligen experimentellen Aufbau auch der unterschiedliche biologische Kontext sein. Somit ist bisher nicht geklärt, welche Einflüsse das von NK-92 Zellen sekretierte IL-10 im Tumor-Mikromilieu genau haben kann, sodass entsprechende Analysen gerechtfertigt und notwendig sind.

In einem weiteren Experiment wurde die Expression der IL-10 Rezeptor Untereinheit IL-10R α auf der Oberfläche von NK-92 Zellen durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.2), um die mögliche Relevanz des autokrin produzierten IL-10 für NK-92 Zellen nachvollziehen zu können. Es wurde eine Aktivierungs-unabhängige, konstitutive Expression des Rezeptors IL-10R α auf parentalen und ErbB2-spezifischen NK-92 Zellen festgestellt, wobei sich diese zwischen den untersuchten Zelllinien nicht unterschied. In der Literatur wurde eine IL-10R α Expression sowohl für NK-92 Zellen als auch für primäre NK-Zellen beschrieben (Park et al.,

2011). Damit könnte das von NK-92 Zellen sekretierte IL-10 grundsätzlich auch auf die Zellen selbst zurückwirken.

5.2 Hemmung der Aktivität von IL-10 durch einen rekombinanten anti-IL-10 Mini-Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAbs) werden therapeutisch für die Behandlung von Krebs- und Autoimmunerkrankungen eingesetzt, da diese die vorteilhafte Eigenschaft besitzen, ihr Zielmolekül mit hoher Spezifität zu erkennen (Bruno et al., 2011; Weiner, 2015). Auch zur Neutralisierung von IL-10 wurden monoklonale Antikörper entwickelt, darunter der humanisierte anti-IL-10 Antikörper BT-063 (PCT/EP2010/068569), der bereits in einer klinischen Phase-I-Studie gegen systemischen Lupus erythematoses getestet wurde (Llorente et al., 2000). Allerdings besitzen IgG-Antikörper, wie BT-063, nur zwei Bindestellen für ihr Zielmolekül, was das therapeutische Potenzial solcher mAbs begrenzen kann. Um die neutralisierende Aktivität gegenüber IL-10 zu verbessern, wurde in dieser Arbeitsgruppe ein rekombinanter anti-IL-10 Mini-Antikörper mit vier Antigen-Bindestellen generiert (Abb. 4.3). Dieser Antikörper ist ein über Disulfidbrücken verbundenes Homodimer eines Fusionsproteins, welches ein scFv-Fragment abgeleitet vom anti-IL-10 Antikörper BT-063 am N-Terminus besitzt. Diesem folgt eine Gelenkregion, die CH2 und CH3-Domänen des humanen IgG4 und ein weiteres von BT-063-abgeleitetes scFv-Fragment am C-Terminus. Die scFv-Fragmente binden einen Sequenzabschnitt von IL-10, der auch durch den Rezeptor IL-10R α erkannt wird (PCT/EP2010/068569). Dabei handelt es sich um ein diskontinuierliches Epitop, das nur in dimerisiertem IL-10 gebildet wird (Zdanov et al., 1995). Die Verwendung des IgG4-Anteils hat den Vorteil, dass diese IgG-Subklasse im Vergleich zu IgG1 eine niedrigere Bindungsaffinität zu Fc-Rezeptoren aufweist und damit nur in geringem Maße eine ADCC oder CDC (*complement dependent cytotoxicity*, Komplement-abhängige Zytotoxizität) induziert (Hansel et al., 2010). Die Antikörpersequenzen wurden in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors inseriert. Die Plasmid-DNA wurde in HEK293 Zellen exprimiert und der Antikörper aus dem Zellkulturüberstand über eine Protein G Affinitätssäule aufgereinigt. Anschließend wurde der anti-IL-10 Mini-Antikörper auf Funktionalität getestet (Abb. 4.4). Die durchflusszytometrische Analyse (Abb. 4.4 A) und die Ergebnisse eines ELISA (Abb. 4.4 B) zeigten, dass der Mini-Antikörper spezifisch an immobilisiertes IL-10 bindet. Um die neutralisierende Aktivität des Mini-Antikörpers zu belegen, wurde die Inhibierung der IL-10-vermittelten STAT3 Aktivierung in IL-10R α -positiven NK-92 Zellen untersucht (Abb. 4.4 C). Die Bindung von IL-10 an IL-10R α führt zur Phosphorylierung von STAT3, was die Translokation von pSTAT3 in den Zellkern initiiert (Finbloom and Winestock, 1995; Kotenko et al., 1997). Dort agiert das Protein als Transkriptionsfaktor und aktiviert die Transkription von Faktoren, die beispielsweise die Expression pro-

inflammatorischer Gene inhibieren (Murray, 2006). Die durchgeführte Immunoblot-Analyse belegte die durch IL-10 induzierte Phosphorylierung von STAT3 in parental NK-92 Zellen. Somit war davon auszugehen, dass auch endogen produziertes IL-10 auf die NK-Zellen zurückwirken und für deren Funktionalität notwendig sein könnte. In Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des anti-IL-10 Mini-Antikörpers erfolgte dagegen keine IL-10-vermittelte STAT3-Phosphorylierung, was die neutralisierende Aktivität des Mini-Antikörpers bekräftigte.

5.3 Hemmung der endogenen IL-10 Expression durch genetische Modifikation von NK-92 Zellen

Neben der Generierung eines rekombinanten IL-10 Antikörpers wurden alternative Ansätze zur IL-10 Depletion analysiert. Diese umfassten die genetische Veränderung der NK-92 Zellen durch Einbringung einer IL-10 mRNA-spezifischen shRNA, eines IL-10-CRISPR/Cas9-Systems oder die intrazelluläre Expression IL-10-spezifischer scFv-Antikörper. Im Fall der IL-10-spezifischen shRNA wurde als Kontrolle eine *scrambled control* shRNA (Ctrl-shRNA) eingesetzt, die keine Komplementarität zu einer existierenden humanen mRNA besitzt. Der dabei genutzte lentivirale Expressionsvektor GIPZ exprimiert unter der Kontrolle des CMV-Promotors ein polycistronisches Transkript, welches neben dem tGFP-Gen auch das Puromycin-Resistenzgen und die shRNA kodiert (Abb. 4.6 A). Wird die shRNA in eine eukaryotische Zelle eingebracht, wird sie zunächst über das Enzym DICER prozessiert und anschließend in den Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) überführt, mit dessen Hilfe die shRNA-Einzelstränge mit komplementären mRNA-Transkripten paaren (Moore et al., 2010). Liegt dabei eine vollständige Komplementarität zur Ziel-mRNA vor, wird diese durch eine Endonuklease im RISC-Komplex geschnitten und abgebaut (Elbashir et al., 2001). Im Gegensatz dazu führt eine partielle Komplementarität zur Ziel-mRNA lediglich zur Inhibierung der Protein-Translation (Filipowicz et al., 2008; Siomi and Siomi, 2009).

Eine vielversprechende und breit eingesetzte Technologie zur Manipulation der Genexpression in Säugerzellen ist das aus Bakterien stammende CRISPR/Cas System. Viele Bakterienarten nutzen dieses System, um sich vor Virusinfektionen und Fremd-DNA zu schützen (Gasiunas et al., 2012). Das in dieser Arbeit verwendete CRISPR/Cas9 System ist ursprünglich vom Bakterium *Streptococcus pyogenes* abgeleitet. Die Komponenten dieses Systems setzen sich im Wesentlichen aus den zwei nicht-kodierenden RNAs crRNA und tracrRNA, sowie der Cas9 Endonuklease zusammen. Die crRNA dient der Identifikation der Fremd-DNA. Weiterhin hybridisieren komplementäre Sequenzabschnitte der crRNA und tracrRNA zu einer doppelsträngigen RNA. Die so entstandene Duplex-RNA bindet über die ausgebildeten Sekundärstrukturen der tracrRNA an das Cas9-Protein und bildet so den vollständigen CRISPR/Cas9 Komplex. Nach Bindung der crRNA an die Zielsequenz

schneiden die im Cas9-Protein vorhandenen Nukleasedomänen (RuvC und HNH) jeweils einen DNA-Einzelstrang und verursachen so einen DNA-Doppelstrangbruch. Für die Anwendung dieser Methode in eukaryotischen Zellen sind die hybridisierenden Sequenzen der crRNA und tracrRNA zu einer chimären guide RNA (gRNA) fusioniert, bei der die an die DNA-bindende Sequenz der crRNA ausgetauscht werden kann (Cong et al., 2013). Da Bakterienzellen keinen Zellkern besitzen, ist es notwendig, das Cas9-Protein durch das Anfügen einer zusätzlichen Kernlokalisationssequenz in den Zellkern eukaryotischer Zellen zu lenken. In dieser Arbeit wurde auf das lentivirale Vektorsystem LentiCRISPRv2-GFP-Puro (Kaulich, unveröffentlicht) zurückgegriffen, um die Komponenten des CRISPR/Cas9 Systems in NK-92 Zellen einzubringen (Abb. 4.8). Die Expression der gRNA steht dabei unter der Kontrolle des U6-Promotors. An diesen Promotor bindet die RNA-Polymerase III, die nicht in der Lage ist, eine 5'-Cap-Struktur an die gRNA anzuhängen, womit der Verbleib der gRNA im Zellkern gewährleistet wird (Mali et al., 2013; Turowski and Tollervey, 2016). Neben der gRNA enthält der Vektor die Sequenz für das Cas9-Protein, deren Expression durch einen EF-1 α -Promotor gesteuert wird. Zur immunologischen Detektion ist das Cas9-Protein am C-Terminus mit einem Flag-Tag markiert. Dem folgt EGFP als Markergen und das Puromycin-Resistenzgen, die über zwei 2A-Peptide mit dem Cas9-Protein verknüpft sind. Um die Wahrscheinlichkeit des vollständigen Abschaltens des IL-10 Gens zu erhöhen, wurden insgesamt vier gRNAs mit Hilfe eines Online-Tools entworfen, die an verschiedene Positionen innerhalb des IL-10 Gens binden. So können über das Schneiden der Cas9-Nuklease mehrere Doppelstrangbrüche im IL-10 Gen erzeugt werden, die u.a. vom zelleigenen Reparaturmechanismus *non-homologous end joining* (NHEJ) erkannt und behoben werden (Lieber, 2008). Allerdings nutzt dieser Mechanismus keine homologe DNA-Sequenz als Vorlage für die Reparatur und ist daher sehr ungenau, sodass Mutationen oder Insertionen und Deletionen (Indels) entstehen. Indels können durch eine Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Stoppkodon führen oder die Proteinfunktion durch die Deletion oder Insertion von Aminosäuren beeinflussen, was in einem Funktionsverlust des Gens (*knockout*) resultieren kann (Peng et al., 2016).

Ein weiterer Ansatz, der in dieser Arbeit getestet wurde, war die intrazelluläre Expression von antagonistischen anti-IL-10 scFv-Antikörpern (Intrabodies, Abb. 4.10). Die hierfür konstruierten Antikörpermoleküle bestehen aus den Antigen-bindenden variablen Domänen der schweren (V_H) und leichten Ketten (V_L) des IL-10-spezifischen Antikörpers BT-063. Beide Domänen sind zur Erhöhung der Stabilität kovalent über einen $(G_4S_3)_3$ -Linker miteinander verbunden (Bird et al., 1988). Durch das Anfügen von Signalsequenzen werden die scFv-Antikörper in bestimmte subzelluläre Kompartimente dirigiert (Kontermann, 2004). So wurden in dieser Arbeit Intrabodies konstruiert, die am C-Terminus die KDEL-Sequenz tragen (α IL-10ER), um im endoplasmatischen Retikulum IL-10 zu binden und zurückzuhalten.

Weiterhin umfasste dieser Ansatz Antikörper, die über die Transmembrandomäne des humanen CD28 Moleküls in der Plasmamembran verankert und somit auf der Zelloberfläche lokalisiert sind (α IL-10TM), oder in den extrazellulären Raum sekretiert werden (α IL-10S), um dort die Aktivität von IL-10 zu blockieren. Solche Antikörperkonstrukte wurden bereits früher erfolgreich eingesetzt, um die Tyrosinkinaserzeptoren ErbB2 und EGFR intrazellulär zu depletieren (Beerli et al., 1994a, b; Muller et al., 2014; Shaki-Loewenstein et al., 2005). Zur immunologischen Detektion tragen die eingesetzten scFv-Antikörper einen HA-Tag, der vom Hämagglutinin Glykoprotein des humanen Influenzavirus abgeleitet ist (Moon et al., 2012). Die scFv-Antikörperkonstrukte wurden in lentivirale pSIEW-Transferplasmide unter der Kontrolle eines SFFV-Promotors und vor eine IRES mit nachgeschaltetem EGFP-Markergen inseriert (Demaion et al., 2002).

Um die beschriebenen Ansätze in parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen zu untersuchen, wurde auf lentivirale Vektoren zurückgegriffen, da diese die vorteilhafte Eigenschaft besitzen, sowohl teilende als auch nicht-teilende Zellen zu infizieren (Sakuma et al., 2012; Vigna and Naldini, 2000). Die Herstellung von VSV-G pseudotypisierten lentiviralen Vektorpartikeln erfolgte in allen Fällen durch die Transfektion von HEK293T Zellen mit einem Drei-Plasmid-System (Zufferey et al., 1997). Der Vektorpartikel-haltige Kulturüberstand wurde nach 72 h im Beisein von Polybren auf die NK-92 Zellen gegeben, um diese entweder mit einer shRNA (pGIPZ-IL-10 shRNA, pGIPZ-Ctrl-shRNA) dem IL-10-CRISPR/Cas9 oder der Cas9-Kontrolle (pLentiCRISPRv2-GFP-Puro-IL-10, pLentiCRISPRv2-GFP-Puro), oder mit einem der scFv-Antikörper-Konstrukte (pS- α IL-10S-IEW, pS- α IL-10TM-IEW, pS- α IL-10ER-IEW) zu transduzieren. Da die Effizienz des viralen Gentransfers in NK-Zellen eher gering ist, wurde die Transduktion von NK-92 Zellen in Anwesenheit des Multi-Kinase-Inhibitors BX795 durchgeführt (Sutlu et al., 2012). BX795 inhibiert den TBK1/IKKe-Komplex, einen Mediator der Signalwege von RIG-I, MDA-5 und TLR3, die nach Erkennung viraler Bestandteile eine antivirale Immunantwort initiieren. Obwohl BX795 genutzt wurde, waren die erhaltenen Transduktionseffizienzen mit maximal 8% immer noch sehr gering, sodass GFP (tGFP, EGFP)-positive NK-92 Zellen über eine Puromycin-Selektion und/oder eine Zellsortierung angereichert wurden. Aus dem reinen Zellpool der CRISPR/Cas9- und Cas9-transduzierten NK-92 Zellen wurden in einem weiteren Sortierschritt Einzelzellen durchflusszytometrisch anhand ihrer EGFP-Expression isoliert, da vorangegangene Analysen auf einen unvollständigen IL-10 *knockout* innerhalb der Zellpopulation hindeuteten (Daten nicht gezeigt). Die angereicherten Zellen wurden expandiert und anschließend auf ihre IL-10 Expression und Funktionalität hin untersucht.

Das Einbringen der spezifischen shRNA resultierte im Vergleich zu den Referenzzellen in einer 77%igen bzw. 83%igen Reduktion der IL-10 mRNA Menge in parentalen bzw. ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen (Abb. 4.6 B). Dies wirkte sich auf die Proteintranslation aus

und führte zu einer verminderten IL-10 Sekretion nach Aktivierung der NK-92 Zellen (Abb. 4.7). So zeigte die Expressionsanalyse mittels Immunoblot, dass IL-10-shRNA-exprimierende parentale NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen nach Stimulierung mit PMA und Ionomycin deutlich weniger IL-10 produzierten, als die jeweils mitgeführten Ctrl-exprimierenden oder unmodifizierten NK-92 Zellen. Die Analyse der IL-10 Sekretion nach Kontakt mit Tumorzellen ergab vergleichbare Resultate. Sowohl im nicht aktivierten Zustand, als auch nach Zielzellkontakt sekretierten shRNA-exprimierende NK-92 Zellen um 60% weniger IL-10 in den Kulturüberstand als NK-92 Zellen transduziert mit dem *scrambled control* Vektor.

Die Verwendung des CRISPR/Cas9 Systems führte zu einem erfolgreichen Abschalten des IL-10 Gens in selektionierten Einzelzellklonen transduzierter NK-92 Zellen (NK-92/IL-10-CRISPR/Cas9, NK-92/5.28.z/IL-10-CRISPR/Cas9, Abb. 4.9). So wurde nach Stimulierung mit PMA und Ionomycin keine für IL-10 spezifische Bande in IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierenden parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen im Immunoblot detektiert. Auch nach Kontakt mit den Tumorzellen K562 bzw. MDA-MB453 konnte kein IL-10 im Kulturüberstand IL-10-CRISPR/Cas9-exprimender parentaler NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen nachgewiesen werden. Dagegen wurde stets eine annähernd äquivalente Menge an IL-10 im Fall unmodifizierter und Cas9-exprimierender NK-92 Zellen detektiert.

Die Expression der IL-10-spezifischen scFv-Antikörper α IL-10S und α IL-10ER wurde in den Zelllysaten der transduzierten NK-92 Zellen mittels Immunoblot mit einem HA-Tag-spezifischen Antikörper bestätigt (Abb. 4.11). Allerdings war es so nicht möglich, den scFv-Antikörper α IL-10TM zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Es ist denkbar, dass das durch den verwendeten anti-HA-Tag-Antikörper detektierte Epitop in der denaturierten Form des α IL-10TM-Antikörpers nicht zugänglich war. Grund dieser Annahme ist der problemlose Nachweis der nativen Konformation des α IL-10TM Antikörpers auf der Oberfläche der NK-92 Zellen mittels Durchflusszytometrie unter Einsatz desselben anti-HA-Tag Antikörpers (Abb. 4.13). Weiterhin spricht dafür, dass die denaturierte Form des scFv-Antikörpers in der Immunoblot-Analyse über einen anti-CD8 α -Antikörper problemlos detektiert werden konnte (Abb. 4.12). Neben den Zelllysaten wurden auch die Zellkulturüberstände auf die Expression der scFv-Antikörper hin analysiert. Wie erwartet wurde die Sekretion des scFv-Antikörpers α IL-10S in den Überstand bestätigt (Abb. 4.11), wohingegen der transmembrane α IL-10TM Antikörper nicht nachweisbar war (Abb. 4.12). Interessanterweise war jedoch der α IL-10ER Antikörper im Kulturüberstand vorzufinden (Abb. 4.11), obwohl dieser durch die terminale KDEL-Retentionssequenz im ER der Zelle festgehalten werden sollte (Lewis and Pelham, 1992). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Überexpression des Antikörpers und eine damit verbundene Sättigung der zu bindenden KDEL-Rezeptoren sein (Crofts et al., 1999). Somit gelangen nicht gebundene Antikörpermoleküle in den sekretorischen Weg und werden aus der Zelle sezerniert. Die Expression der scFv-Antikörper in NK-92 Zellen wirkte sich

unterschiedlich auf die IL-10 Ausschüttung aus. So wurde nach Ko-Inkubation mit Tumorzellen 57% (parentale NK-92) bzw. 15% (NK-92/5.28.z) weniger IL-10 im Kulturüberstand von α IL-10S-exprimierenden NK-92 Zellen nachgewiesen als bei der unmodifizierten Kontrolle. Die Expression des α IL-10TM-Antikörpers reduzierte die IL-10 Konzentration um 88% (parentale NK-92) bzw. 82% (NK-92/5.28.z). Die IL-10 Ausschüttung wurde durch das Einbringen des α IL-10ER-Antikörpers in parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen um 97% reduziert. Damit war die Hemmung ähnlich effizient wie nach CRISPR/Cas9-induziertem IL-10 Gen-*knockout*.

5.4 Proliferation und Anti-Tumor-Aktivität IL-10-depletierter NK-92 Zellen *in vitro*

Nach dem Nachweis einer erfolgreichen IL-10 Depletion wurden die Konsequenzen der verminderten IL-10 Expression auf das Wachstum und die Zytotoxizität von NK-92 Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass parentale NK-92 Zellen, welche eine reduzierte IL-10 Sekretion durch die Expression einer IL-10-spezifischen shRNA aufwiesen, ähnlich schnell proliferierten, wie der mitgeführte Kontrollansatz (Abb. 4.16). Gleiches wurde für CAR-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen beobachtet. Zudem töteten shRNA-exprimierende parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen die Tumorzelllinien K562 oder MDA-MB453 in nahezu identischer Weise ab wie unmodifizierte NK-92 Zellen (Abb. 4.17, Abb. 4.18). Allerdings war auffällig, dass die Expression der Ctrl-shRNA das Wachstum und die Zytotoxizität von NK-92 Zellen beeinträchtigte. So wurden an Tag 7 42% weniger NK-92/5.28.z/Ctrl-shRNA Zellen gezählt als unmodifizierte Kontrollzellen. Ctrl-shRNA-exprimierende parentale NK-92 Zellen wiesen dagegen keine Auffälligkeiten in ihrem Wachstumsverhalten auf. Allerdings töteten Ctrl-exprimierende parentale NK-92 Zellen in einem zweistündigen Zytotoxizitätsassay die Tumorzellen K562 weniger effizient ab, als die unmodifizierten oder IL-10-shRNA-exprimierenden NK-Zellen. Ein Einfluss der Ctrl-shRNA Expression auf die natürliche oder CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität konnte für NK-92/5.28.z Zellen wiederum nicht nachgewiesen werden. Zwar definiert sich eine *scrambled control* als eine zufällige Reihenfolge an Nukleotiden, die keine Zielsequenz im Transkriptom der Zelle haben, dennoch sind unspezifische Effekte durch die Bindung der shRNA an Nicht-Ziel-mRNAs nicht auszuschließen (Jackson and Linsley, 2010; Sledz and Williams, 2004). Es wäre auch denkbar, dass sich im Zuge der Transduktion das Provirus-Genom der Lentiviren in verschiedene transkriptionell aktive Bereiche der NK-92 Zelllinien integrierte und damit in parentalen NK-92 Zellen einen von NK-92/5.28.z Zellen verschiedenen Phänotyp induzierte. Im Vergleich zu unmodifizierten Zellen beeinflusste die Expression des Cas9 Proteins oder die vollständige Eliminierung der IL-10 Expression mittels CRISPR/Cas9 Gen-Editierung weder die Proliferation noch die natürliche oder CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität parental

und ErbB2-spezifischer CAR NK-92 Zellen. Gleiches wurde für α IL-10S- und α IL-10ER-exprimierende NK-92 Zellen beobachtet. Da auch exogen zugeführtes IL-10 keine Auswirkungen auf die Proliferation von primären NK-Zellen hat (Mocellin et al., 2004b), ist generell anzunehmen, dass IL-10 für das Wachstum von NK-Zellen nicht relevant ist. Das unveränderte Wachstumsverhalten von NK-92 Zellen, die die scFv-Antikörper α IL-10S und α IL-10ER exprimieren, weist darauf hin, dass nicht von einer durch diese Fremdmoleküle induzierten UPR auszugehen ist, die andernfalls den Zelltod begünstigen würde (Kaufman, 1999). Dies wurde durch Expressionsanalysen der ER-spezifischen Stressproteine BiP und p α IF2 α mittels Immunoblot bestätigt (Abb. 4.14). So wurde keine Expressionssteigerung des Chaperons BiP und keine Phosphorylierung des Proteins α IF2 α in NK-92 Zellen nach Expression der scFv-Antikörper α IL-10S und α IL-10ER beobachtet. In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass auch die Expression des Chaperons GRP94 nicht durch die intrazelluläre Expression eines scFv-Antikörpers heraufreguliert wurde (Zhang et al., 2012). Damit ist eine durch die Intrabody-Expression induzierte UPR auszuschließen.

Dass das von NK-92 Zellen produzierte IL-10 keine Rolle für deren natürliche und CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität spielt, wurde durch Zytotoxizitätsstudien in Gegenwart des rekombinanten anti-IL-10 Mini-Antikörpers bekräftigt (Abb. 4.5). So zeigte sich, dass parentale NK-92 Zellen und NK-92/5.28.z Zellen in Ab- und Anwesenheit des Mini-Antikörpers K562 Tumorzellen in einem ähnlichen Ausmaß lysierten. Auch die spezifische Lyse von MDA-MB453 Zellen durch NK-92/5.28.z Zellen blieb unbeeinflusst. In einer anderen Arbeit wurde nachgewiesen, dass IL-10 die mRNA-Expression von Genen erhöht, die die Aktivierung und Zytotoxizität von primären NK-Zellen modulieren (Mocellin et al., 2004b). Allerdings ist anzumerken, dass die NK-Zellen dort vorab mit exogen zugeführtem IL-10 stimuliert und nicht mit Tumorzellen aktiviert wurden. Somit ist ein Einfluss von IL-10 auf die Zytotoxizität von NK-Zellen nicht gänzlich auszuschließen, und könnte im Fall der NK-92 Zellen durchaus konzentrationsabhängig sein (Carson et al., 1995).

Im Widerspruch zu den beschriebenen Beobachtungen verhielten sich NK-92 Zellen, die den α IL-10TM-Antikörper exprimierten (Abb. 4.16, 4.17, 4.18). Für NK-92/5.28.z/ α IL-10TM Zellen wurde eine signifikant schlechtere Zytotoxizität gegenüber K562 und MDA-MB453 Zellen im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollzellen beobachtet. Zudem proliferierten die Zellen deutlich langsamer. Ein langsames Wachstum und eine verminderte Lyserate gegenüber K562 Zellen wurde auch für α IL-10TM-exprimierende parentale NK-92 Zellen nachgewiesen. Derartige Effekte wurden für α IL-10ER- oder α IL-10S Antikörper-exprimierende NK-92 Zellen nicht festgestellt, so dass sie offenbar nicht im Zusammenhang mit einer reduzierten IL-10 Sekretion stehen. Die Ursache hierfür liegt vermutlich stattdessen im Aufbau des α IL-10TM Antikörpers. Das scFv-Antikörperkonstrukt α IL-10TM besitzt am C-Terminus die Transmembrandomäne von CD28, um den α IL-10TM-Antikörper in der Zellmembran zu

verankern. In anderen Arbeiten der Gruppe wurde gezeigt, dass die Herunterregulation der CD28 Expression in parentalen und CAR NK-92 Zellen zu einer verminderten Wachstumsrate und zytotoxischen Aktivität der Zellen führte (Zhang et al., unveröffentlicht). So könnte die eingebrachte Transmembrandomäne von CD28 mit endogenen CD28-Molekülen interagieren, die damit nicht mehr zur Signalweiterleitung innerhalb der Zelle zur Verfügung stehen. Am stärksten waren die beobachteten negativen Effekte in NK-92/5.28.z Zellen, die neben der transmembranen CD28-Domäne der α IL-10TM-Antikörper auch die kostimulatorische CD28-Domäne des CAR-Moleküls besitzen.

5.5 Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine nach Depletion von IL-10 in NK-92 Zellen

Da mehrfach beschrieben wurde, dass IL-10 die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in Immunzellen hemmen kann (siehe Einleitung 1.5.3), wurde ein möglicher Einfluss der IL-10 Depletion in NK-92 Zellen auf deren Zytokin-Ausschüttung (IFN- γ , MIP-1 α und TNF- α) untersucht (Abb. 4.19, 4.20). Die Ausschüttung der genannten Botenstoffe geht einher mit der Aktivierung von NK-Zellen (Fauriat et al., 2010). So sekretierten parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen mit natürlicher IL-10 Expression erst nach Kontakt mit Tumorzellen große Mengen an IFN- γ in den Kulturüberstand (Abb. 4.19). Wurden die NK-92 Zellen in Abwesenheit von Tumorzellen kultiviert, wurde nur eine geringe Konzentration von IFN- γ im Überstand detektiert. Im Fall von MIP-1 α wurde bereits im ruhenden Zustand der parentalen NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen eine hohe Ausschüttung festgestellt, welche nach Kontakt der NK-Zellen mit den Tumorzellen weiter verstärkt wurde. Dass eine erhöhte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und MIP-1 α in NK-92 Zellen nach Zielzellkontakt induziert wird, wurde für NK-92/5.28.z Zellen bereits nachgewiesen (Nowakowska et al., 2018; Schonfeld et al., 2015) und deckt sich mit den gewonnenen Daten für primäre NK-Zellen (Fauriat et al., 2010). Die IL-10 Depletion mittels exprimierter IL-10-shRNA beeinflusste die IFN- γ und MIP-1 α Ausschüttung in parentalen und ErbB2-spezifischen CAR NK-92 Zellen nur unwesentlich. So wurden annähernd gleiche Konzentrationen der Zytokine für IL-10-shRNA-exprimierende NK-92 Zellen und unmodifizierte NK-92 Zellen gemessen. Allerdings wurde für Ctrl-shRNA-exprimierende parentale NK-92 Zellen eine verminderte IFN- γ Ausschüttung in den Kulturüberstand beobachtet. Da NK-92/Ctrl-shRNA Zellen in vorherigen Experimenten K562 Tumorzellen deutlich schlechter lysierten als die mitgeführten unmodifizierten NK-Zellen, ist die reduzierte Zytokin-Ausschüttung und die geringere Zytotoxizität wohl mit einer verminderten Aktivierung der Zellen zu erklären. Dies zeigte sich auch für parentale und ErbB2-spezifische CAR NK-92 Zellen, die den scFv-Antikörper α IL-10TM exprimierten. So war die IFN- γ Ausschüttung im Vergleich zu den unmodifizierten NK-92 Zellen signifikant reduziert, was mit einer deutlich schlechteren Lyse

der Tumorzellen einherging. Die Expression der scFv-Antikörper α IL-10S und α IL-10ER, sowie die Expression des IL-10-CRISPR/Cas9 Systems oder der Cas9-Kontrolle wirkten sich dagegen nur unwesentlich auf die IFN- γ und MIP-1 α Produktion aus. Dies legt nahe, dass das endogen produzierte IL-10 keinen nennenswerten Einfluss auf die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und MIP-1 α in NK-92 Zellen hat.

Neben den zuvor beschriebenen Zytokinen wurden die Kulturüberstände auch auf das Zytokin TNF- α getestet (Abb. 4.20). Für parentale NK-92 Zellen mit und ohne veränderte IL-10 Sekretion wurde selbst nach Zielzellkontakt kein TNF- α im Überstand nachgewiesen. Gleiches wurde für nicht aktivierte NK-92/5.28.z Zellen festgestellt. Hier wurde allerdings eine TNF- α Sekretion nach Kontakt mit Zielantigen-exprimierenden Tumorzellen induziert (Schonfeld et al., 2015). Eine Reduktion der IL-10 Expression mittels shRNA steigerte die TNF- α Produktion in NK-92/5.28.z Zellen weiter, was auch für α IL-10ER-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen nach Aktivierung mit MDA-MB453 und B16-F10/ErbB2 Tumorzellen beobachtet wurde (Abb. 4.21, 4.27). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das autokrin sekretierte IL-10 die Produktion von TNF- α in NK-92/5.28.z Zellen beeinträchtigt, was so bereits für primäre NK-Zellen beschrieben wurde (Moore et al., 2001). Allerdings gibt es auch Daten, die eine IL-10-vermittelte Steigerung der IL-2-induzierten TNF- α Produktion zeigen (Carson et al., 1995), wohingegen in anderen Studien die TNF- α Ausschüttung in NK-Zellen trotz exogen zugeführtem IL-10 unverändert blieb (Mocellin et al., 2004b; Park et al., 2011). Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse der IL-10-CRISPR/Cas9-exprimierenden Zellen. Sowohl der IL-10 Gen-editierte Zellpool (Daten nicht gezeigt) als auch der selektionierte Einzelzellklon wiesen eine deutlich verminderte TNF- α Ausschüttung auf als die Cas9-exprimierenden NK-Zellen. Allerdings war auffällig, dass Cas9-exprimierende Einzelzellklone deutlich mehr TNF- α in den Kulturüberstand sekretierten als die unmodifizierten Kontrollzellen, obwohl die TNF- α Ausschüttung im Fall der Zellpools bei unmodifizierten und Cas9-exprimierenden Zellen ähnlich war. Demnach könnte ein kompletter IL-10 *knockout* zu einer verminderten TNF- α Expression führen, was so in der Literatur bisher nicht beschrieben ist. Dagegen wurde in IL-10 *knockout* Mäusen eine erhöhte TNF- α Konzentration im Serum der Tiere im Vergleich zu Kontrollmäusen nachgewiesen (Cohen et al., 2004). Es wäre auch denkbar, dass die konstitutive Expression des CRISPR/Cas9 Systems in NK-92/5.28.z Zellen die Modifikation anderer Genabschnitte als der gewünschten zur Folge hat (*off-target*-Ereignisse), was nach wie vor ein Problem bei der Nutzung dieser Technologie darstellt (Peng et al., 2016; Schaefer et al., 2017). Beispielsweise könnten Zielsequenzen betroffen sein, die als wichtige regulatorische Elemente für die TNF- α Expression fungieren.

5.6 Bewertung der untersuchten Strategien zur IL-10 Depletion

Von den in dieser Arbeit untersuchten Ansätzen erscheint vor allem der Einsatz des anti-IL-10 Mini-Antikörpers und die intrazelluläre Expression des α IL-10ER Antikörpers in NK-92 Zellen als sehr gut geeignet, um das von NK-92 Zellen sekretierte IL-10 zu depletieren. So wurde die biologische Aktivität des von NK-92 Zellen sezernierten IL-10 durch die Anwesenheit des anti-IL-10 Mini-Antikörpers vollständig neutralisiert (Abb. 4.4) und die IL-10 Sekretion durch die Expression des α IL-10ER Antikörpers in einem ähnlichen Ausmaß reduziert, wie nach dem CRISPR/Cas9-induzierten IL-10 Gen-*knockout* (Abb. 4.9, 4.15). Zudem wurde die Proliferation und Funktionalität der modifizierten NK-92 Zellen hierdurch nicht wesentlich beeinträchtigt. Daneben besitzen beide Strategien die vorteilhafte Eigenschaft, ihr Ziel-Molekül mit hoher Spezifität zu binden. Die intrazelluläre Expression des α IL-10S Antikörpers in NK-92 Zellen reduzierte die IL-10 Sekretion nach Ko-Inkubation mit Tumorzellen um 57% (parentale NK-92) bzw. 15% (NK-92/5.28.z) (Abb. 4.15). Damit erwies sich dieser Ansatz weniger effizient als die Verminderung der IL-10 Sekretion durch die Expression des scFv-Antikörpers α IL-10ER. Da vor allem NK-92/5.28.z Zellen durch die Expression des α IL-10TM Antikörpers in ihrer Funktionalität beeinträchtigt wurden, erscheint auch die Weiterverfolgung dieser Strategie wenig sinnvoll.

Das RNAi-vermittelte *silencing* der IL-10 mRNA unter Verwendung einer spezifischen shRNA reduzierte die IL-10 Expression auf post-transkriptioneller Ebene. Allerdings wurde im Vergleich zu unmodifizierten NK-92 Zellen im Zellkulturüberstand der shRNA-exprimierenden NK-92 Zellen nur ca. 60% weniger IL-10 Protein im nicht aktivierten oder aktivierten Zustand nachgewiesen (Abb. 4.6, Abb. 4.7). So könnte die verbliebene Proteinmenge durchaus ausreichen, um die normale Proteinfunktion von IL-10 zu erhalten. Ein weiterer Nachteil dieses Ansatzes ist die Möglichkeit einer Interferenz der shRNA mit mRNAs, die nur teilweise Homologien zu deren Ziel-mRNA aufweisen (Rao et al., 2009). Solche *off-target*-Effekte könnten die Beeinträchtigung der Funktionalität der NK-92 Zellen nach Expression der Ctrl-shRNA erklären.

Der Vorteil des CRISPR/Cas9 Systems ist die hohe Effizienz bei der Erzeugung eines Doppelstrangbruches in der genomischen DNA. So induzierte das in dieser Arbeit eingesetzte IL-10-CRISPR/Cas9 System einen kompletten *knockout* des IL-10 Gens in selektionierten NK-92 Zellen. Auch mit diesem Ansatz zeigte sich, dass das autokrin produzierte IL-10 bei NK-92 Zellen keine Rolle für das Wachstum, die Zytotoxizität und die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und MIP-1 α spielt. Allerdings ist die unbeabsichtigte Modifikation von Nicht-Ziel-Genen nach wie vor ein Problem dieser Technologie (Peng et al., 2016). Im Zuge dessen könnte die veränderte TNF- α Sekretion als *off-target* Ereignis bewertet werden. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz für weitergehende Untersuchungen nicht näher in Betracht gezogen.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die von CAR-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen sekretierten Botenstoffe auf die Reifung von DCs und die Polarisierung von Makrophagen haben und inwiefern sich eine IL-10 Depletion in NK-92/5.28.z auf diese Prozesse auswirkt, wurden Transwell-Experimente mit *in vitro* generierten Monozyten-abgeleiteten DCs (MoDC) und Makrophagen (MDM) mit NK-92/5.28.z/αIL-10ER Zellen oder mit NK-92/5.28.z Zellen in Anwesenheit des rekombinanten anti-IL-10 Mini-Antikörpers durchgeführt.

5.7 Einfluss IL-10-depletierter NK-92/5.28.z Zellen auf die Reifung dendritischer Zellen

Unreife MoDC wurden nach einem Standardprotokoll in Wachstumsmedium mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 generiert (Sallusto et al 1994). Werden Monozyten mit GM-CSF allein kultiviert, differenzieren diese zu Makrophagen, welche sich morphologisch und phänotypisch eindeutig von MoDC abgrenzen lassen (Palucka et al., 1998; Peters et al., 1987). So weisen Makrophagen ein adhärentes Wachstum auf und zeichnen sich u.a. durch eine hohe Expression des Oberflächenmarkers CD14 aus. Daher ist die Zugabe von IL-4 ein sehr essentieller Faktor, um die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen zu unterdrücken (Peters et al., 1993; Ruppert et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit konnten die für sieben Tage mit GM-CSF und IL-4 kultivierten Suspensionszellen eindeutig als unreife MoDC identifiziert werden. So zeichneten sich die Zellen neben ihrer Morphologie durch eine fehlende CD14 Expression auf ihrer Oberfläche aus. Für den unreifen Phänotyp charakteristisch wurde eine moderate Menge an CD40, CD86 und HLA-DR auf der Oberfläche der MoDC nachgewiesen, wohingegen CD83 nur sehr schwach auf den Zellen exprimiert war (Abb. 4.22) (Hubo et al., 2013; Romani et al., 1996; Sasawatari et al., 2006). Im Vergleich dazu waren die Marker CD80 und PD-L1 bereits sehr stark auf diesen Zellen exprimiert. Unreife dendritische Zellen sind in nahezu allen peripheren Geweben des Körpers zu finden und besitzen eine hohe Kapazität zur Antigen-Aufnahme (Banchereau and Steinman, 1998). So werden die extrazellulären Bestandteile aufgenommen, prozessiert und als Peptide auf der Oberfläche der dendritischen Zellen durch MHC-Klasse II präsentiert. Allerdings sind unreife dendritische Zellen aufgrund der geringen Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle nicht in der Lage, T-Zellen zu stimulieren. Nur ausgereifte dendritische Zellen können eine effektive Tumor-spezifische Immunantwort induzieren (Feuerstein et al 2000). Neben der Antigen-Aufnahme sind eine Reihe verschiedener exogener Stimuli an der Induktion der DC-Reifung beteiligt, wie pathogene Moleküle, die Wechselwirkung zwischen DC und T-Zelle über den CD40 Liganden, oder pro-inflammatorische Zytokine (Banchereau et al., 2000). Bei der Durchführung des Transwell-Experiments wurden als Kontrollansatz unreife MoDC mit dem von Jonuleit et al. 1997 eingeführten Zytokin-Cocktail bestehend aus den vier pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6, IL-1β, TNF-α und PGE2 für 24 h gereift (Jonuleit et al.,

1997). Die so behandelten MoDC wiesen eine im Vergleich zu unreifen MoDC gesteigerte Expression der Oberflächenmarker CD40, CD80, CD86, HLA-DR und PD-L1 auf, was dem Phänotyp reifer DCs entspricht (Banchereau and Steinman, 1998; Brown et al., 2003; Jonuleit et al., 1997; Sasawatari et al., 2006) (Abb. 4.23). Wurden unreife MoDC mit IL-10 versetzt, so wurde auf den behandelten Zellen eine Zunahme der Oberflächenexpression von CD40, CD80 und PD-L1 nachgewiesen, die aber wesentlich weniger ausgeprägt war, als nach der Behandlung mit IL-1 β , IL-6, PGE2 und TNF- α . Hingegen blieb die Expression der Marker CD83, CD86 und HLA-DR unbeeinflusst und ähnelte der auf unbehandelten MoDC. Damit hat exogen zugeführtes IL-10 allein offenbar keinen signifikanten Einfluss auf die Reife-Induktion unreifer MoDC. Die im Transwell-Experiment mitgeführten MDA-MB453 Tumorzellen allein, sowie nicht aktivierte oder mit Tumorzellen stimulierte parentale NK-92 Zellen übten keinen nennenswerten Einfluss auf die Markerexpression der MoDC aus, sodass eine durch diese Konditionen induzierte Reifung der MoDC ausgeschlossen werden kann. Die sekretierten Botenstoffe nicht aktivierter unmodifizierter NK-92/5.28.z und IL-10-depletierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen führten zwar zu einer moderaten Expressionssteigerung der Oberflächenmarker CD40, CD80 und PD-L1, allerdings blieb die Expression der übrigen Marker unbeeinflusst. Da vor allem die Expressionssteigerung der Marker CD83, CD86 und HLA-DR repräsentativ für den Reife-Prozess von DCs ist, ist auch hier von keiner Reife-Induktion auszugehen. Anders verhielt es sich nach der Stimulierung der NK-Zellen mit MDA-MB453 Tumorzellen. Die sekretierten Botenstoffe aktivierter unmodifizierter NK-92/5.28.z Zellen führten zu einer gesteigerten Expression von CD86 und HLA-DR auf den MoDC. Zudem wurde auf den MoDC ein erhöhtes Expressionsniveau der Marker CD40, CD80 und PD-L1 nachgewiesen. Zwar blieb die CD83 Expression unbeeinflusst, dennoch ist aus den Daten zu schließen, dass die sezernierten löslichen Faktoren aktivierter NK-92/5.28.z Zellen die Reifung der MoDC eingeleitet haben. Daran könnten vor allem die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α beteiligt gewesen sein, die von aktivierten NK-92/5.28.z Zellen in großen Mengen sekretiert werden (Abb. 4.19, 4.21) und nachweislich bei der Reife-Induktion dendritischer Zellen eine wichtige Rolle spielen (Vitale et al., 2005a). Auf den MoDC, die den löslichen Faktoren aktivierter NK-92/5.28.z Zellen ausgesetzt waren, war der Marker PD-L1 deutlich stärker exprimiert als auf MoDC, die mit IL-1 β , IL-6, PGE2 und TNF- α versetzt wurden. Dieser Effekt kann ebenfalls auf das von NK-92/5.28.z Zellen sezernierte IFN- γ zurückgeführt werden. So wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass IFN- γ die PD-L1 Expression auf Tumorzellen erhöht (Abiko et al., 2015; Mimura et al., 2018). Eine im ähnlichen Ausmaß gesteigerte Expression von CD40, CD80 und PD-L1 wurde auch auf MoDC beobachtet, die mit den sekretierten Botenstoffen IL-10-depletierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen stimuliert wurden. Zudem wurde auf diesen MoDC eine erhöhte Oberflächenexpression von CD83, CD86 und HLA-DR nachgewiesen. Dabei wurden die genannten Marker signifikant stärker

exprimiert als auf MoDC, die durch die löslichen Faktoren aktivierter unmodifizierter NK-92/5.28.z Zellen beeinflusst waren. Dies zeigt, dass die IL-10 Depletion die durch NK-92/5.28.z Zellen induzierte Reifung der MoDC fördert. So könnte das von NK-92/5.28.z Zellen ausgeschüttete IL-10 den löslichen Faktoren entgegenwirken, die die Reifung der MoDC einleiten. Ähnliches konnten Corinti et al. mit autokrin produziertem IL-10 von DCs zeigen. Dabei wurde die über LPS oder den CD40 Liganden induzierte Reifung und die damit verbundene Expressionserhöhung von CD80, CD83, CD86 und HLA-DR auf DCs in Anwesenheit eines anti-IL-10 Antikörpers noch weiter gesteigert (Corinti et al., 2001). Daneben verstärkte die Neutralisierung von IL-10 die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α , was charakteristisch für einen reifen Phänotyp der DCs ist. Auch die in NK-92/5.28.z/ α IL-10ER im Vergleich zu unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen erhöhte TNF- α Sekretion nach Aktivierung (Abb. 4.21, Abb. 4.27), könnte zur gesteigerten DC-Reifung beitragen, da TNF- α ein essentieller Faktor für die Reifung dendritischer Zellen ist (Jonuleit et al., 1997). Zusammengefasst zeigen die hier erhaltenen Daten, dass eine IL-10 Depletion in NK-92/5.28.z Zellen erheblich zur Reife-Induktion von dendritischen Zellen beiträgt. In nachfolgenden funktionellen Analysen muss jedoch untersucht werden, ob die so behandelten MoDC tatsächlich die Ausbildung der Effektorfunktion Antigen-spezifischer T-Zellen initiieren und damit eine adaptive Anti-Tumor-Immunantwort auslösen können.

5.8 Einfluss der Hemmung von IL-10 in NK-92/5.28.z Zellen auf die Polarisierung von Makrophagen

Unpolarisierte Monozyten-abgeleitete Makrophagen (MDM) wurden in Teflon-beschichteten Beuteln generiert (Menck et al., 2014). Dabei wurde auf den Zusatz des Wachstumsfaktors M-CSF verzichtet, da unter M-CSF generierte Makrophagen bereits Eigenschaften eines M2-ähnlichen Phänotyps aufweisen (Martinez et al., 2006). Die unpolarisierten Makrophagen waren durchweg positiv für die Expression der Oberflächenmarker CD14, CD80, CD86 und HLA-DR (Abb. 4.24). Im Fall des Markers CD163 wurde nur eine sehr geringe Menge auf der Oberfläche der MDM detektiert. Bei der Durchführung der Transwell-Experimente wurden Makrophagen zur Kontrolle in Abwesenheit von NK-Zellen mit IFN- γ und LPS oder mit IL-10 versetzt, um entweder einen M1- oder M2-ähnlichen Phänotyp zu induzieren. Unpolarisierte Makrophagen, welche mit IFN- γ und LPS behandelt wurden, differenzierten wie erwartet in einen M1-ähnlichen Phänotyp, der sich durch eine erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86 und HLA-DR auszeichnete (Abb. 4.25, 4.26) (Benoit et al., 2008; Iqbal and Kumar, 2015; Martinez and Gordon, 2014). Zudem wiesen die so behandelten MDM eine verminderte CD14 und CD163 Expression auf. Die Hauptaufgabe von M1-ähnlichen Makrophagen besteht in der Abwehr von Mikroorganismen (Williams et al., 2016). Zudem weisen diese Zellen antitumorale Eigenschaften auf. So töten M1-Makrophagen neoplastisch

veränderte Zellen direkt ab, sekretieren hohe Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen und fungieren als Antigen-präsentierende Zellen, die die Aktivierung MHC-II-restringierter CD4⁺ T-Zellen vermitteln (Mantovani and Sica, 2010). Im Gegensatz zum M1-Phänotyp kann der M2-ähnliche Phänotyp durch verschiedene Differenzierungssignale, darunter IL-10, induziert werden (Martinez and Gordon, 2014). Die in dieser Arbeit mit IL-10 behandelten MDM exprimierten deutlich weniger CD86 und HLA-DR auf ihrer Oberfläche, als mit IFN- γ und LPS versetzte MDM. Hingegen war die Expression von CD14 erhöht. Zudem wurde eine Zunahme der CD80 Expression im Vergleich zu unbehandelten MDM nachgewiesen, die aber wesentlich weniger ausgeprägt war, als nach der Behandlung mit IFN- γ und LPS. Dass IL-10 durchaus in der Lage ist, die Expression von CD80 moderat zu steigern, wurde bereits für Monozyten gezeigt (Creery et al., 1996). Entgegen den Erwartungen konnte hier keine durch IL-10 gesteigerte CD163 Expression nachgewiesen werden, die ansonsten charakteristisch für IL-10 induzierte M2-Makrophagen ist (Iqbal and Kumar, 2015; Roszer, 2015). Grund dafür könnte sein, dass die Konzentration an exogen zugeführtem IL-10 in diesem Versuchsaufbau nicht ausreichend war. M2-ähnliche Makrophagen wirken immunsuppressiv, sind an der Beseitigung von Zelltrümmern beteiligt und fördern die Wundheilung und die Tumorprogression (Mosser and Edwards, 2008; Murray and Wynn, 2011).

Die im Transwell-Experiment mitgeführten MDA-MB453 Tumorzellen allein, sowie nicht aktivierte oder mit Tumorzellen stimulierte parentale NK-92 Zellen bewirkten keine eindeutige Polarisierung der MDM in einen M1- oder M2-ähnlichen Phänotyp. Gleiches wurde für unmodifizierte NK-92/5.28.z Zellen in Ab- und Anwesenheit des anti-IL-10 Mini-Antikörpers und für IL-10-depletierte NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen im nicht aktivierten Zustand beobachtet. Wurden unpolarisierte MDM jedoch den sekretierten Botenstoffen der mit MDA-MB453 Tumorzellen stimulierten NK-92/5.28.z Zellen ausgesetzt, so differenzierten die Makrophagen in einen M2-ähnlichen Phänotyp (Abb. 4.25, 4.26). Dies war auch in Anwesenheit des IgG4-Kontroll-Proteins der Fall (Abb. 4.25). Die so behandelten MDM zeichneten sich durch eine zu unbehandelten MDM um 40 - 50% verringerte Expression der Oberflächenmarker CD86 und HLA-DR aus. Wie für den M2-Phänotyp charakteristisch, wurde auf der Oberfläche der MDM auch eine erhöhte Expression von CD14 und CD163 nachgewiesen (Avdic et al., 2013; Iqbal and Kumar, 2015). Dass es sich hierbei um IL-10-vermittelte Effekte handelte, wurde nach IL-10 Neutralisierung durch den anti-IL-10 Mini-Antikörper und die verminderte IL-10 Sekretion nach Expression des α IL-10ER-Antikörpers in NK-92/5.28.z Zellen deutlich. Dabei wurden die durch unmodifizierte, aktivierte NK-92/5.28.z Zellen ausgelösten Effekte partiell oder vollständig aufgehoben und die Ausprägung eines M1-ähnlichen Phänotyps wurde gefördert, angezeigt durch eine erhöhte Expression von CD86 und eine verminderte Expression von CD14 und CD163 auf den MDM (Abb. 4.25, 4.26). Im Vergleich zu unbehandelten MDM oder MDM, die mit unmodifizierten NK-92/5.28.z Zellen

kultiviert waren, wurde auch die Expression des Oberflächenmarkers HLA-DR auf MDM gesteigert, die den löslichen Faktoren aktivierter NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen ausgesetzt waren (Abb. 4.26). Eine erhöhte HLA-DR Expression ist ebenfalls charakteristisch für die Polarisierung in M1-Makrophagen (Martinez and Gordon, 2014). Auch die Anwesenheit des anti-IL-10 Mini-Antikörpers wirkte der durch NK-92/5.28.z Zellen verminderten HLA-DR Expression auf den MDM entgegen, allerdings ähnelte das Expressionsniveau von HLA-DR dabei dem auf unbehandelten MDM (Abb. 4.27). Dies zeigt an, dass die eingesetzte Konzentration des anti-IL-10 Mini-Antikörpers zwar ausreichend war, um die nachteiligen Effekte des durch NK-92/5.28 Zellen ausgeschütteten IL-10 auf die HLA-DR Expression zu neutralisieren, jedoch keine Steigerung im Vergleich zur basalen Expression von HLA-DR bewirkte. Die Ausprägung von M1-ähnlichen Eigenschaften der MDM kann auf das von aktivierten NK-92/5.28.z Zellen ausgeschüttete IFN- γ zurückzuführen sein (Abb. 4.19), das hauptsächlich an der Polarisierung zu M1-Makrophagen beteiligt ist (Martinez and Gordon, 2014). Aktivierte NK-92/5.28.z Zellen sezernieren allerdings deutlich mehr IL-10 als IFN- γ (Abb. 4.1, 4.19), sodass die durch IL-10-vermittelten Effekte offenbar überwiegen und die Polarisierung in M2-ähnliche Makrophagen begünstigt wird. Dies würde sich mit den Daten von de Waal Malefyt et al. decken, die zeigten, dass IL-10 die IFN- γ -induzierte Expression von MHC-Klasse II Molekülen auf der Oberfläche von Monozyten unterdrückt (de Waal Malefyt et al., 1991b). Erst mit der Neutralisierung der IL-10 Aktivität oder einer verminderten IL-10 Ausschüttung aktivierter NK-92/5.28.z Zellen kann offenbar die durch IFN- γ begünstigte Polarisierung in M1-Makrophagen stattfinden. In der Tumor-Mikroumgebung kann diese Umprogrammierung von Makrophagen von Bedeutung für die Anti-Tumor-Antwort sein. Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) sind die am häufigsten vorkommenden Immunzellen im Tumorstroma (Mantovani et al., 2008; Qian and Pollard, 2010). Diese können zwar durch verschiedene Stimuli in M1- und M2-Makrophagen polarisiert werden, allerdings überwiegen TAMs mit einem M2-ähnlichen Phänotyp (Biswas and Mantovani, 2010; Solinas et al., 2009). Diese Zellen fördern das Tumorwachstum, die Tumorausbreitung, die Neoangiogenese und die Metastasierung. Zudem zeichnen sich diese Zellen durch die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine aus. So sezernieren Tumorzellen bestimmte Botenstoffe, die Monozyten anlocken und diese dann zu TAMs mit pro-tumoralen Eigenschaften umwandeln (Qian et al., 2011). Dabei spielt nachweislich auch IL-10 eine essentielle Rolle. Dieser Prozess könnte durch das von NK-92/5.28.z Zellen sekretierte IL-10 weiter gefördert werden und zur immunsupprimierenden Umgebung des Tumors beitragen. Durch eine verminderte IL-10 Produktion in NK-92/5.28.z Zellen wäre es dagegen möglich, die Polarisierung von TAMs mit M1-ähnlichen Eigenschaften zu fördern, die antitumorale Eigenschaften besitzen. Diese Hypothese muss allerdings in einem geeigneten Tiermodell weiter geprüft werden.

5.9 Analyse der Anti-Tumor-Aktivität von α IL-10ER-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen *in vivo*

In den hier durchgeführten *in vitro* Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Wachstum und Funktionalität von NK-92/5.28.z Zellen durch eine intrinsische IL-10 Depletion nicht beeinflusst werden. Zudem förderte eine verminderte IL-10 Sekretion die durch NK-92/5.28.z Zellen induzierte Reifung ko-kultivierter dendritischer Zellen und begünstigte die Polarisierung von Makrophagen in einen M1-ähnlichen Phänotyp. Diese Effekte könnten die therapeutische Wirkung IL-10-depletierter NK-92/5.28.z Zellen *in vivo* durch gleichzeitige Aktivierung endogener Immunzellen steigern. Um die antitumorale Aktivität von NK-92/5.28.z/ α IL-10ER *in vivo* zu untersuchen, wurde ein immunkompetentes Mausmodell unter Nutzung der murinen Melanom-Zelllinie B16-F10 etabliert. Die von der Arbeitsgruppe um Kershaw und Darcy (Australien) zur Verfügung gestellten B16-F10/ErbB2 Zellen (Pegram et al., 2008) exprimieren das von NK-92/5.28.z erkannte humane Zielantigen ErbB2 auf ihrer Oberfläche (Abb. 4.27 A). In *in vitro* Zytotoxizitätsstudien wurde die effektive Lyse von B16-F10/ErbB2 Tumorzellen durch NK-92/5.28.z Zellen bestätigt. So wurden B16-F10/ErbB2 Zellen durch unmodifizierte und α IL-10ER-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen in einem ähnlichen Ausmaß abgetötet, wohingegen parentale ErbB2-negative B16-F10 Melanomzellen kaum lysiert wurden (Abb. 4.27 B). Somit zeigte sich auch hier, dass die verringerte IL-10 Ausschüttung nach Expression des α IL-10ER-Antikörpers die CAR-vermittelte spezifische Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen nicht beeinflusst (Abb. 4.18). C57BL/6N Albino Mäuse wurden subkutan mit syngenem B16-F10/ErbB2 Zellen inokuliert und durch peritumorale Injektion von parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen bzw. DPBS behandelt. Dabei verlängerte die wiederholte Behandlung der subkutanen B16-F10 Melanome mit NK-92/5.28.z oder NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen das Überleben der Mäuse (Abb. 4.28). Im Vergleich dazu verstarb die Mehrzahl der mit parentalen NK-92 Zellen oder DPBS therapierten Mäuse bereits vor Behandlungsende an Tag 24. Somit ist davon auszugehen, dass NK-92/5.28.z Zellen auch *in vivo* ihre lytische Aktivität beibehalten. Allerdings wurde keine komplette Tumorabstoßung in den mit NK-92/5.28.z Zellen behandelten Mäuse beobachtet. In früheren Arbeiten der Gruppe wurden dagegen die Mehrzahl immunkompetenter C57BL/6 Mäuse mit syngenem ErbB2-exprimierenden GL261-Gliomen durch die lokale Behandlung mit NK-92/5.28.z Zellen geheilt (Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2017). Im hier durchgeführten B16-F10/ErbB2 Modell wurde kein wesentlicher Unterschied im Überleben der Tiere nach Behandlung mit unmodifizierten oder IL-10 manipulierten NK-92/5.28.z Zellen festgestellt. B16-F10 Tumoren zeichnen sich durch ihre Aggressivität und ihre geringe Immunogenität aus (Overwijk and Restifo, 2001). Ein Grund dafür ist die geringe bis ganz fehlende MHC-Klasse I Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen (Seliger et al., 2001) (Abb. 4.29), die die Zellen vor Angriffen zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen schützt. So wurde gezeigt, dass die ektopische Expression von

MHC-Klasse I Molekülen auf B16-F10 Tumorzellen zu deren Abstoßung im immun-kompetenten Tiermodell führte (Gorelik et al., 1990; Li et al., 1996). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer induzierten MHC-Klasse I Expression, um eine T-Zell-vermittelte Immunantwort auszulösen (Garrido et al., 2016). Vor allem das pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ ist in der Lage, die Expression von MHC-Klasse I Molekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen zu induzieren (Seliger et al., 2001). So könnte auch das von NK-92/5.28.z sekretierte IFN- γ grundsätzlich dazu beitragen, die MHC-Klasse I Expression auf B16-F10 Zellen wiederherzustellen. Allerdings wirkt humanes IFN- γ Spezies-spezifisch und ist nur in humanen Zellen biologisch aktiv (Schroder et al., 2004). Eine Heraufregulation der MHC-Klasse I Expression auf den murinen B16-F10 Zellen durch humanes IFN- γ kann damit ausgeschlossen werden, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abb. 4.29). Im Gegensatz dazu ist humanes IL-10 sowohl auf humanen als auch murinen Zellen wirksam, sodass das von NK-92/5.28.z Zellen in hohen Mengen sekretierte IL-10 auf die Tumorzellen wirkt (Vieira et al., 1991; Zdanov et al., 1995) und dabei die Erkennung der B16-F10/ErbB2 Melanomzellen durch das Immunsystem dämpfen könnte. So wurde eine durch IL-10-vermittelte Herunterregulation von MHC-Klasse I Molekülen auf der Oberfläche von Melanomzellen nachgewiesen (Yue et al., 1997). IL-10 kann auch die Expression von NKG2D-Liganden auf der Oberfläche von Melanomzellen inhibieren und damit die Erkennung und Lyse durch NK-Zellen hemmen (Serrano et al., 2011), die andernfalls MHC-Klasse I-negative Zellen als solche erkennen und gezielt abtöten (Karre et al., 1986). Zudem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das von NK-92/5.28.z sezernierte IL-10 *in vitro* die Reifung von DCs beeinträchtigt und die Polarisierung von Makrophagen hin zu einem M2-ähnlichen Phänotyp induziert (Abb. 4.23, 4.25, 4.26), was *in vivo* ebenfalls einer endogenen Anti-Tumor-Antwort entgegenwirken würde. Dennoch konnte in diesem *in vivo*-Modell die Hemmung der IL-10 Sekretion in NK-92/5.28.z/ α IL-10ER Zellen keinen entscheidenden Beitrag zur Induktion einer endogenen Anti-Tumor-Immunantwort leisten, was auf die fehlende Aktivität des ausgeschütteten humanen IFN- γ zurückgeführt werden könnte. Da die IL-10 Depletion in NK-92/5.28.z Zellen den Therapieerfolg jedoch nicht verschlechterte, ist davon auszugehen, dass von NK-92/5.28.z Zellen in diesem Modell keine durch IL-10-vermittelte immunstimulatorische Effekte ausgelöst werden, die zur Tumorregression beitragen.

5.10 Modulation der Tumor-Mikroumgebung zur Verbesserung des Erfolgs der adoptiven Immuntherapie

Eine Eigenschaft, die eine neoplastisch veränderte Tumorzelle von einer gesunden Körperzelle unterscheidet, ist die Fähigkeit, dem Angriff des körpereigenen Immunsystems zu entgehen (Hanahan and Weinberg, 2011). Die adoptive Zelltherapie, die u.a. die Ausstattung von T-Zellen und NK-Zellen mit CAR Molekülen umfasst, hat in den letzten Jahren

vielversprechende Ergebnisse im Kampf gegen hämatologische Krebserkrankungen hervorgebracht (Yip and Webster, 2018). Allerdings wurde in präklinischen Untersuchungen und klinischen Phase-I-Studien gezeigt, dass die Zytotoxizität von CAR Lymphozyten gegenüber Krebszellen von soliden Tumoren beschränkt ist, was nicht zuletzt auf die von den Tumorzellen mit gesteuerte immunsupprimierende Tumor-Mikroumgebung zurückgeführt wird (D'Aloia et al., 2018). So wird die immunsupprimierende Tumor-Mikroumgebung u.a. durch die chemotaktische Rekrutierung von Suppressorzellen wie Tregs, TAMs mit M2-ähnlichen Eigenschaften und MDSCs und durch die Sekretion immunsupprimierender Zytokine aufrechterhalten, die auch den Erfolg einer adoptiven Zelltherapie beeinträchtigen können. In diesem Zusammenhang spielt auch IL-10 eine essentielle Rolle. So ist IL-10 an der Ausbildung von Tregs und TAMs mit M2-ähnlichen Eigenschaften beteiligt, die die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen unterdrücken und die Tumorprogression fördern (Hsu et al., 2015; Quatromoni and Eruslanov, 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch das von aktivierten NK-92/5.28.z Zellen ausgeschüttete IL-10 zur Polarisierung von Makrophagen mit M2-Eigenschaften beitragen kann. In präklinischen Tiermodellen wurde gezeigt, dass die Depletion von TAMs mit M2-Eigenschaften durch die Gabe eines CSF-1R Inhibitors (Mok et al., 2014) oder die Depletion von Tregs durch eine geringe Dosis an Cyclophosphamid die Effizienz der adoptiven Zelltherapie steigern kann (Ercolini et al., 2005; Lutsiak et al., 2005). Daneben wurden auch erste Strategien zur Hemmung der Sekretion oder Expression von IL-10 verfolgt. So steigerte die Neutralisierung der IL-10 Aktivität durch chimäre Moleküle (Immunadhäsine), bestehend aus der extrazellulären Domäne des IL-10R1 und dem Fc-Teil des humanen IgG1, die IFN- γ Produktion von allogenen PBMCs (Teraï et al., 2009). Ein shRNA-vermittelter *knockdown* von IL-10R und TGF- β in dendritischen Zellen initiierte eine starke Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort (Ahn et al., 2015). Allerdings wurden derartige Ansätze noch nicht im Zusammenhang mit einer adoptiven Zelltherapie getestet.

Auch die in dieser Arbeit eingesetzte CAR NK-Zelllinie NK-92/5.28.z kann zur Modulation der Tumor-Mikroumgebung beitragen. So wurde die Mehrzahl immunkompetenter C57BL/6 Mäuse mit syngeneten ErbB2-exprimierenden GL261-Gliomen durch lokale Behandlung mit NK-92/5.28.z dauerhaft von ihren Tumoren geheilt (Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2017). Diese Tiere entwickelten humorale Immunantworten gegen die Krebszellen und stießen erneut implantierte ErbB2-positive GL261 Tumorzellen ab. Ebenso wurde eine Beteiligung von T-Zellen nachgewiesen. Durch die CAR-vermittelte Lyse der Tumorzellen werden Tumorantigene freigesetzt, die wiederum von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und präsentiert werden können, um CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren (Albert et al., 1998; Iyoda et al., 2002). NK-Zellen töten zudem unreife DCs ab, die die Expansion von Tregs fördern (Van Elssen et al., 2014). Das von NK-92/5.28.z sekretierte pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ kann die Polarisierung von TAMs mit einem M1-ähnlichen Phänotyp und

zusammen mit TNF- α die Reifung dendritischer Zellen begünstigen. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass das von NK-92/5.28.z Zellen gleichzeitig sekretierte IL-10 diesen Prozessen entgegenwirkt. So könnte das durch die adoptive Zelltherapie eingebrachte IL-10 nicht nur die Funktion der Antigen-präsentierenden Zellen beeinträchtigen, sondern auch an der Ausbildung von Tregs beteiligt sein. Die hier erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass die Inhibierung der IL-10 Sekretion in NK-92/5.28.z Zellen die Wirkung der von CAR NK-92 Zellen sezernierten pro-inflammatorischen Zytokine verstärken kann, welche einen wesentlichen Einfluss auf Immunzellen in der Tumor-Mikroumgebung haben.

5.11 Ausblick

In dieser Doktorarbeit wurden erfolgreich verschiedene Ansätze verfolgt, um das von NK-92 Zellen sekretierte IL-10 in seiner Produktion, Sekretion oder Aktivität zu hemmen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass IL-10 dabei keine Rolle für die Proliferation und Zytotoxizität von NK-92 Zellen spielt und die Sekretion der Zytokine IFN- γ und MIP-1 α nicht beeinflusst. Die von NK-92/5.28.z Zellen nach Hemmung der IL-10 Expression oder Aktivität weiterhin sezernierten pro-inflammatorischen Zytokine förderten dagegen die Reifung von dendritischen Zellen und induzierten die Polarisierung von Makrophagen hin zu einem M1-ähnlichen Phänotyp. Diese Zelltypen spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Tumorspezifischen adaptiven Immunantwort. Allerdings wurde in dem hier durchgeführten Tiermodell nach Hemmung von IL-10 keine erhöhte Anti-Tumor-Aktivität von NK-92/5.28.z Zellen beobachtet. Um nun genauer zu untersuchen, inwieweit sich eine reduzierte IL-10 Sekretion im Tiermodell bei einer CAR NK-92 Zell-Therapie auf die endogene Immunantwort gegen den Tumor auswirkt, werden gegenwärtig Experimente durchgeführt, in denen Tumor tragende Mäuse mit NK-92/5.28.z Zellen und murinem IFN- γ behandelt werden. Dadurch soll die fehlende Wirkung des von CAR NK-92 Zellen ausgeschütteten humanen IFN- γ ersetzt werden, welches vor allem für die Ausbildung der Effektorfunktion Antigen-spezifischer T-Zellen wichtig ist. Obwohl die Behandlung mit IL-10-depletierten NK-92/5.28.z Zellen zu keinem entscheidenden Unterschied im Überleben der Tiere im Vergleich zur Therapie mit unmodifizierten CAR NK-92 Zellen führte, könnten sich die Tumoren der behandelten Tiere bezüglich der infiltrierten Immunzellen unterscheiden. Um den möglichen Einfluss der IL-10 Depletion auf die Zusammensetzung verschiedener Immunzellpopulationen in der Tumor-Mikroumgebung zu analysieren, sollten in zukünftigen Experimenten tumorinfiltrierende Immunzellen wie Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen in immunhistochemischen oder durchflusszytometrischen Analysen untersucht werden. Daneben könnten Tumor-Xenograft-Modelle in immundefizienten Mäusen (NSG) etabliert werden, die mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes transplantiert werden (Walsh et al., 2017). Dies

bietet die Möglichkeit, die Interaktion verabreichter NK-92 Zellen mit umgebenden Immunzellen humanen Ursprungs *in vivo* zu untersuchen.

Eine Alternative zur Blockade von immunsupprimierenden Zytokinen stellt das Zuführen exogener pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12 und IL-15 dar, die die Tumor-Mikroumgebung modulieren und die Anti-Tumor-Aktivität von Immunzellen steigern können (Chmielewski et al., 2011; Patidar et al., 2016; Weiss et al., 2007). So wurde in dieser Arbeitsgruppe gezeigt, dass das Einbringen von IL-15 in CAR-exprimierende NK-92 Zellen das Überleben und die Zytotoxizität dieser Zellen auch in Abwesenheit von exogenem IL-2 gewährleistet (Sahm et al., 2012). Dies könnte in zukünftigen Arbeiten dazu genutzt werden, in CAR NK-Zellen die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine mit der Hemmung der IL-10 Sekretion zu kombinieren, um eine gesteigerte Aktivierung der endogenen Anti-Tumor-Immunantwort zu erzielen.

6 Literaturverzeichnis

- Abiko, K., Matsumura, N., Hamanishi, J., Horikawa, N., Murakami, R., Yamaguchi, K., Yoshioka, Y., Baba, T., Konishi, I., and Mandai, M. (2015). IFN-gamma from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer* 112, 1501-1509.
- Adris, S., Klein, S., Jasnis, M., Chuluyan, E., Ledda, M., Bravo, A., Carbone, C., Chernajovsky, Y., and Podhajcer, O. (1999). IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response. *Gene Ther* 6, 1705-1712.
- Aguet, M., Dembic, Z., and Merlin, G. (1988). Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell* 55, 273-280.
- Ahmed, N., Brawley, V., Hegde, M., Bielamowicz, K., Kalra, M., Landi, D., Robertson, C., Gray, T.L., Diouf, O., Wakefield, A., *et al.* (2017). HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol* 3, 1094-1101.
- Ahn, Y.H., Hong, S.O., Kim, J.H., Noh, K.H., Song, K.H., Lee, Y.H., Jeon, J.H., Kim, D.W., Seo, J.H., and Kim, T.W. (2015). The siRNA cocktail targeting interleukin 10 receptor and transforming growth factor-beta receptor on dendritic cells potentiates tumour antigen-specific CD8(+) T cell immunity. *Clin Exp Immunol* 181, 164-178.
- Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2, 725-731.
- Akdis, C.A., and Blaser, K. (2001). Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 103, 131-136.
- Alas, S., Emmanouilides, C., and Bonavida, B. (2001). Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res* 7, 709-723.
- Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359-1368.
- Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L., and Mantovani, A. (1998). IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 28, 359-369.
- Altwater, B., Landmeier, S., Pscherer, S., Temme, J., Schweer, K., Kailayangiri, S., Campana, D., Juergens, H., Pule, M., and Rossig, C. (2009). 2B4 (CD244) signaling by recombinant antigen-specific chimeric receptors costimulates natural killer cell activation to leukemia and neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res* 15, 4857-4866.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 25, 2097-2116.
- Arai, S., Meagher, R., Swearingen, M., Myint, H., Rich, E., Martinson, J., and Klingemann, H. (2008). Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy* 10, 625-632.
- Asadullah, K., Sterry, W., and Volk, H.D. (2003). Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 55, 241-269.
- Avdic, S., Cao, J.Z., McSharry, B.P., Clancy, L.E., Brown, R., Steain, M., Gottlieb, D.J., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2013). Human cytomegalovirus interleukin-10 polarizes monocytes toward a deactivated M2c phenotype to repress host immune responses. *J Virol* 87, 10273-10282.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

- Beckhove, P., Feuerer, M., Dolenc, M., Schuetz, F., Choi, C., Sommerfeldt, N., Schwendemann, J., Ehlert, K., Altevogt, P., Bastert, G., *et al.* (2004). Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest* 114, 67-76.
- Beerli, R.R., Wels, W., and Hynes, N.E. (1994a). Autocrine inhibition of the epidermal growth factor receptor by intracellular expression of a single-chain antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 204, 666-672.
- Beerli, R.R., Wels, W., and Hynes, N.E. (1994b). Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation. *J Biol Chem* 269, 23931-23936.
- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181, 3733-3739.
- Berlato, C., Cassatella, M.A., Kinjyo, I., Gatto, L., Yoshimura, A., and Bazzoni, F. (2002). Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol* 168, 6404-6411.
- Beury, D.W., Parker, K.H., Nyandjo, M., Sinha, P., Carter, K.A., and Ostrand-Rosenberg, S. (2014). Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. *J Leukoc Biol* 96, 1109-1118.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., and Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17, 189-220.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11, 889-896.
- Boissel, L., Tuncer, H.H., Betancur, M., Wolfberg, A., and Klingemann, H. (2008). Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 1031-1038.
- Boonstra, A., Rajsbaum, R., Holman, M., Marques, R., Asselin-Paturel, C., Pereira, J.P., Bates, E.E., Akira, S., Vieira, P., Liu, Y.J., *et al.* (2006). Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* 177, 7551-7558.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E., and Brooks, A.G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 187, 813-818.
- Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L., and Moretta, A. (2005). Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol* 26, 221-226.
- Boyiadzis, M., Agha, M., Redner, R.L., Sehgal, A., Im, A., Hou, J.Z., Farah, R., Dorritie, K.A., Raptis, A., Lim, S.H., *et al.* (2017). Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using "off-the-shelf" activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy* 19, 1225-1232.
- Brehm, C., Huenecke, S., Quaiser, A., Esser, R., Bremm, M., Kloess, S., Soerensen, J., Kreyenberg, H., Seidl, C., Becker, P.S., *et al.* (2011). IL-2 stimulated but not unstimulated NK cells induce selective disappearance of peripheral blood cells: concomitant results to a phase I/II study. *PLoS One* 6, e27351.
- Bridgeman, J.S., Hawkins, R.E., Hombach, A.A., Abken, H., and Gilham, D.E. (2010). Building better chimeric antigen receptors for adoptive T cell therapy. *Curr Gene Ther* 10, 77-90.
- Brown, C.E., Alizadeh, D., Starr, R., Weng, L., Wagner, J.R., Naranjo, A., Ostberg, J.R., Blanchard, M.S., Kilpatrick, J., Simpson, J., *et al.* (2016). Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med* 375, 2561-2569.
- Brown, J.A., Dorfman, D.M., Ma, F.R., Sullivan, E.L., Munoz, O., Wood, C.R., Greenfield, E.A., and Freeman, G.J. (2003). Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 170, 1257-1266.

- Brown, M.H., Boles, K., van der Merwe, P.A., Kumar, V., Mathew, P.A., and Barclay, A.N. (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* 188, 2083-2090.
- Bruno, V., Battaglia, G., and Nicoletti, F. (2011). The advent of monoclonal antibodies in the treatment of chronic autoimmune diseases. *Neurol Sci* 31 Suppl 3, 283-288.
- Buechler, C., Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J., and Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 67, 97-103.
- Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M., and Willems, F. (1997). Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 27, 756-762.
- Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Pierard, G., Delville, J.P., Velu, T., and Goldman, M. (1995). Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 25, 2668-2672.
- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1, 779-786.
- Bustelo, X.R. (2001). Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* 20, 6372-6381.
- Calzada-Wack, J.C., Frankenberger, M., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1996). Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. *J Inflamm* 46, 78-85.
- Capsoni, F., Minonzio, F., Ongari, A.M., Carbonelli, V., Galli, A., and Zanussi, C. (1995). IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 58, 351-358.
- Carlsten, M., Bjorkstrom, N.K., Norell, H., Bryceson, Y., van Hall, T., Baumann, B.C., Hanson, M., Schedvins, K., Kiessling, R., Ljunggren, H.G., *et al.* (2007). DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res* 67, 1317-1325.
- Carpenito, C., Milone, M.C., Hassan, R., Simonet, J.C., Lakhal, M., Suhoski, M.M., Varela-Rohena, A., Haines, K.M., Heitjan, D.F., Albelda, S.M., *et al.* (2009). Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3360-3365.
- Carson, W.E., Lindemann, M.J., Baiocchi, R., Linett, M., Tan, J.C., Chou, C.C., Narula, S., and Caligiuri, M.A. (1995). The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 85, 3577-3585.
- Cartellieri, M., Feldmann, A., Koristka, S., Arndt, C., Loff, S., Ehninger, A., von Bonin, M., Bejestani, E.P., Ehninger, G., and Bachmann, M.P. (2016). Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer J* 6, e458.
- Castriconi, R., Dondero, A., Corrias, M.V., Lanino, E., Pende, D., Moretta, L., Bottino, C., and Moretta, A. (2004). Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer Res* 64, 9180-9184.
- Chang, C.C., and Ferrone, S. (2007). Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. *Cancer Immunol Immunother* 56, 227-236.
- Chatelain, R., Wollenberg, A., Martin, C., Panhans-Gross, A., Bieber, T., Degitz, K., and Heckmann, M. (1998). IL-10 inhibits ICAM-1 expression on human Langerhans cells but not on keratinocytes, dermal endothelial cells or fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 290, 477-482.
- Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., and Geha, R. (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* 143, 1283-1289.
- Chen, W.F., and Zlotnik, A. (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 147, 528-534.
- Childs, R.W., and Berg, M. (2013). Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013, 234-246.

- Chmielewski, M., Kopecky, C., Hombach, A.A., and Abken, H. (2011). IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res* 71, 5697-5706.
- Ciuffi, A. (2008). Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Curr Gene Ther* 8, 419-429.
- Cohen, S.B., Parry, S.L., Feldmann, M., and Foxwell, B. (1997). Autocrine and paracrine regulation of human T cell IL-10 production. *J Immunol* 158, 5596-5602.
- Cohen, S.L., Moore, A.M., and Ward, W.E. (2004). Interleukin-10 knockout mouse: a model for studying bone metabolism during intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 10, 557-563.
- Commins, S., Steinke, J.W., and Borish, L. (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1108-1111.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., *et al.* (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-640.
- Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S., and Girolomoni, G. (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 166, 4312-4318.
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., and Hsu, M.L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7, 273-282.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123-133.
- Coudert, J.D., and Held, W. (2006). The role of the NKG2D receptor for tumor immunity. *Semin Cancer Biol* 16, 333-343.
- Crawley, J.B., Williams, L.M., Mander, T., Brennan, F.M., and Foxwell, B.M. (1996). Interleukin-10 stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and p70 S6 kinase is required for the proliferative but not the antiinflammatory effects of the cytokine. *J Biol Chem* 271, 16357-16362.
- Creery, W.D., Diaz-Mitoma, F., Filion, L., and Kumar, A. (1996). Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur J Immunol* 26, 1273-1277.
- Crofts, A.J., Leborgne-Castel, N., Hillmer, S., Robinson, D.G., Phillipson, B., Carlsson, L.E., Ashford, D.A., and Denecke, J. (1999). Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *Plant Cell* 11, 2233-2248.
- D'Aloia, M.M., Zizzari, I.G., Sacchetti, B., Pierelli, L., and Alimandi, M. (2018). CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis* 9, 282.
- D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M., and Trinchieri, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178, 1041-1048.
- Davila, M.L., Riviere, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., Chung, S.S., Stefanski, J., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., *et al.* (2014). Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 6, 224ra225.
- De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1997). Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27, 1229-1235.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., and de Vries, J.E. (1991a). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174, 1209-1220.
- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., and de Vries, J.E. (1991b). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174, 915-924.

- Defrance, T., Vanbervliet, B., Briere, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 175, 671-682.
- Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., and Romagnani, S. (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150, 353-360.
- Demaison, C., Parsley, K., Brouns, G., Scherr, M., Battmer, K., Kinnon, C., Grez, M., and Thrasher, A.J. (2002). High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13, 803-813.
- Deniz, G., Erten, G., Kucuksezer, U.C., Kocacik, D., Karagiannidis, C., Aktas, E., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2008). Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 180, 850-857.
- Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., *et al.* (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 208, 1989-2003.
- Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., and Shevach, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 151, 1224-1234.
- Disis, M.L., Knutson, K.L., Schiffman, K., Rinn, K., and McNeel, D.G. (2000). Pre-existent immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with HER-2/neu overexpressing breast and ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62, 245-252.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-998.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Sheehan, K.C., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J.D., Diamond, M.S., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., *et al.* (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 6, 722-729.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6, 836-848.
- Ehrlich, P. (1909). Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 5, 73-290.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Emmerich, J., Mumm, J.B., Chan, I.H., LaFace, D., Truong, H., McClanahan, T., Gorman, D.M., and Oft, M. (2012). IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Res* 72, 3570-3581.
- Ercolini, A.M., Ladle, B.H., Manning, E.A., Pfannenstiel, L.W., Armstrong, T.D., Machiels, J.P., Bieler, J.G., Emens, L.A., Reilly, R.T., and Jaffee, E.M. (2005). Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 201, 1591-1602.
- Eshhar, Z. (1997). Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. *Cancer Immunol Immunother* 45, 131-136.
- Eshhar, Z., Waks, T., Bendavid, A., and Schindler, D.G. (2001). Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. *J Immunol Methods* 248, 67-76.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., and Schindler, D.G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 720-724.
- Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H., and Gallagher, G. (1997). Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 46, 120-128.
- Farkona, S., Diamandis, E.P., and Blasutig, I.M. (2016). Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med* 14, 73.
- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167-2176.

- Ferlazzo, G., Semino, C., and Melioli, G. (2001). HLA class I molecule expression is up-regulated during maturation of dendritic cells, protecting them from natural killer cell-mediated lysis. *Immunol Lett* 76, 37-41.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102-114.
- Finbloom, D.S., and Winestock, K.D. (1995). IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 155, 1079-1090.
- Finney, H.M., Akbar, A.N., and Lawson, A.D. (2004). Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol* 172, 104-113.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170, 2081-2095.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., and O'Garra, A. (1991a). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147, 3815-3822.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., and O'Garra, A. (1991b). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146, 3444-3451.
- Fitzer-Attas, C.J., Schindler, D.G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1998). Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation. *J Immunol* 160, 145-154.
- Fluckiger, A.C., Garrone, P., Durand, I., Galizzi, J.P., and Banchereau, J. (1993). Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J Exp Med* 178, 1473-1481.
- Fortsch, D., Rollinghoff, M., and Stenger, S. (2000). IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 165, 978-987.
- Foulds, L. (1954). The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14, 327-339.
- Frank, D.A., Robertson, M.J., Bonni, A., Ritz, J., and Greenberg, M.E. (1995). Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7779-7783.
- Frohn, C., Hoppner, M., Schlenke, P., Kirchner, H., Koritke, P., and Luhm, J. (2002). Anti-myeloma activity of natural killer lymphocytes. *Br J Haematol* 119, 660-664.
- Fuentes, M.B., Kacha, A.K., Kline, J., Woo, S.R., Kranz, D.M., Murphy, K.M., and Gajewski, T.F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 208, 2005-2016.
- Fujisaki, H., Kakuda, H., Imai, C., Mullighan, C.G., and Campana, D. (2009). Replicative potential of human natural killer cells. *Br J Haematol* 145, 606-613.
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253-268.
- Garcia-Hernandez, M.L., Hernandez-Pando, R., Gariglio, P., and Berumen, J. (2002). Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology* 105, 231-243.
- Garrido, F., Aptsiauri, N., Doorduijn, E.M., Garcia Lora, A.M., and van Hall, T. (2016). The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 39, 44-51.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E2579-2586.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157, 798-805.

- Genssler, S., Burger, M.C., Zhang, C., Oelsner, S., Mildenerger, I., Wagner, M., Steinbach, J.P., and Wels, W.S. (2016). Dual targeting of glioblastoma with chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells overcomes heterogeneity of target antigen expression and enhances antitumor activity and survival. *Oncoimmunology* 5, e1119354.
- Gerard, C.M., Bruyns, C., Delvaux, A., Baudson, N., Dargent, J.L., Goldman, M., and Velu, T. (1996). Loss of tumorigenicity and increased immunogenicity induced by interleukin-10 gene transfer in B16 melanoma cells. *Hum Gene Ther* 7, 23-31.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195, 327-333.
- Gething, M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10, 465-472.
- Giovarelli, M., Musiani, P., Modesti, A., Dellabona, P., Casorati, G., Allione, A., Consalvo, M., Cavallo, F., di Pierro, F., De Giovanni, C., *et al.* (1995). Local release of IL-10 by transfected mouse mammary adenocarcinoma cells does not suppress but enhances antitumor reaction and elicits a strong cytotoxic lymphocyte and antibody-dependent immune memory. *J Immunol* 155, 3112-3123.
- Gong, J.H., Maki, G., and Klingemann, H.G. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8, 652-658.
- Gorelik, E., Jay, G., Kwiatkowski, B., and Herberman, R.B. (1990). Increased sensitivity to MHC-nonrestricted lysis of BL6 melanoma cells by transfection with class I H-2Kb gene. *J Immunol* 145, 1621-1632.
- Grada, Z., Hegde, M., Byrd, T., Shaffer, D.R., Ghazi, A., Brawley, V.S., Corder, A., Schonfeld, K., Koch, J., Dotti, G., *et al.* (2013). TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e105.
- Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., and Rosenberg, S.A. (1982). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155, 1823-1841.
- Gross, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10024-10028.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 184, 19-29.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1998). Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J Immunol* 160, 3188-3193.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Gruber, M.F., Williams, C.C., and Gerrard, T.L. (1994). Macrophage-colony-stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 beta and inhibited by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 152, 1354-1361.
- Grupp, S.A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D.L., Rheingold, S.R., Teachey, D.T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J.F., *et al.* (2013). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 368, 1509-1518.
- Guedan, S., Chen, X., Madar, A., Carpenito, C., McGettigan, S.E., Frigault, M.J., Lee, J., Posey, A.D., Jr., Scholler, J., Scholler, N., *et al.* (2014). ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood* 124, 1070-1080.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hansel, T.T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J.A., and George, A.J. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 9, 325-338.

- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-1108.
- Hayes, R.L., Koslow, M., Hiesiger, E.M., Hymes, K.B., Hochster, H.S., Moore, E.J., Pierz, D.M., Chen, D.K., Budzilovich, G.N., and Ransohoff, J. (1995). Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* 76, 840-852.
- Haynes, N.M., Snook, M.B., Trapani, J.A., Cerruti, L., Jane, S.M., Smyth, M.J., and Darcy, P.K. (2001). Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma. *J Immunol* 166, 182-187.
- Hegde M, M.M., Grada Z, Pignata A, Landi D, Navai SA, Wakefield A, Fousek K, Bielamowicz K, Chow KK, Brawley VS, Byrd TT, Krebs S, Gottschalk S, Wels WS, Baker ML, Dotti G, Mamonkin M, Brenner MK, Orange JS, Ahmed N. (2016). Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape. *J Clin Invest* 126, 3036–3052.
- Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., and Lavrin, D.H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 16, 230-239.
- Hombach, A., and Abken, H. (2007). Costimulation tunes tumor-specific activation of redirected T cells in adoptive immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 56, 731-737.
- Hombach, A., Heuser, C., Sircar, R., Tillmann, T., Diehl, V., Kruis, W., Pohl, C., and Abken, H. (1997). T cell targeting of TAG72+ tumor cells by a chimeric receptor with antibody-like specificity for a carbohydrate epitope. *Gastroenterology* 113, 1163-1170.
- Hombach, A., Schneider, C., Sent, D., Koch, D., Willemsen, R.A., Diehl, V., Kruis, W., Bolhuis, R.L., Pohl, C., and Abken, H. (2000). An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells. *Int J Cancer* 88, 115-120.
- Hombach, A., Wieczarkowicz, A., Marquardt, T., Heuser, C., Usai, L., Pohl, C., Seliger, B., and Abken, H. (2001). Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol* 167, 6123-6131.
- Hombach, A.A., Rappl, G., and Abken, H. (2013). Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation". *Mol Ther* 21, 2268-2277.
- Houghton, A.N. (1994). Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med* 180, 1-4.
- Hsu, D.H., Moore, K.W., and Spits, H. (1992). Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol* 4, 563-569.
- Hsu, P., Santner-Nanan, B., Hu, M., Skarratt, K., Lee, C.H., Stormon, M., Wong, M., Fuller, S.J., and Nanan, R. (2015). IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *J Immunol* 195, 3665-3674.
- Hu, B.T., and Insel, R.A. (1999). Up-regulation of telomerase in human B lymphocytes occurs independently of cellular proliferation and with expression of the telomerase catalytic subunit. *Eur J Immunol* 29, 3745-3753.
- Hu, X., Chen, J., Wang, L., and Ivashkiv, L.B. (2007). Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol* 82, 237-243.
- Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., and Jonuleit, H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol* 4, 82.
- Hudecek, M., Lupo-Stanghellini, M.T., Kosasih, P.L., Sommermeyer, D., Jensen, M.C., Rader, C., and Riddell, S.R. (2013). Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res* 19, 3153-3164.

- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356, 1795-1799.
- Iqbal, S., and Kumar, A. (2015). Characterization of In vitro Generated Human Polarized Macrophages. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 06: 380.
- Ishikawa, E., Tsuboi, K., Saijo, K., Harada, H., Takano, S., Nose, T., and Ohno, T. (2004). Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* 24, 1861-1871.
- Itoh, K., and Hirohata, S. (1995). The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol* 154, 4341-4350.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195, 1289-1302.
- Jackson, A.L., and Linsley, P.S. (2010). Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 9, 57-67.
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K.W., and Schmidt, R.E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 31, 3121-3127.
- Jeannin, P., Lecoanet, S., Delneste, Y., Gauchat, J.F., and Bonnefoy, J.Y. (1998). IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 160, 3555-3561.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27, 3135-3142.
- Josephson, K., Logsdon, N.J., and Walter, M.R. (2001). Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. *Immunity* 15, 35-46.
- Jovasevic, V.M., Gorelik, L., Bluestone, J.A., and Mokrý, M.B. (2004). Importance of IL-10 for CTLA-4-mediated inhibition of tumor-eradicating immunity. *J Immunol* 172, 1449-1454.
- Kahlon, K.S., Brown, C., Cooper, L.J., Raubitschek, A., Forman, S.J., and Jensen, M.C. (2004). Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res* 64, 9160-9166.
- Kalos, M., Levine, B.L., Porter, D.L., Katz, S., Grupp, S.A., Bagg, A., and June, C.H. (2011). T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3, 95ra73.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13, 1211-1233.
- Kerkar, S.P., and Restifo, N.P. (2012). Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res* 72, 3125-3130.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5, 117-121.
- Klingemann, H. (2014). Are natural killer cells superior CAR drivers? *Oncoimmunology* 3, e28147.
- Klingemann, H., Boissel, L., and Toneguzzo, F. (2016). Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Front Immunol* 7, 91.
- Klingemann, H.G., and Martinson, J. (2004). Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 6, 15-22.
- Klingemann, H.G., and Miyagawa, B. (1996). Purging of malignant cells from blood after short ex vivo incubation with NK-92 cells. *Blood* 87, 4913-4914.
- Klingemann, H.G., Wong, E., and Maki, G. (1996). A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2, 68-75.

- Kontermann, R.E. (2004). Intrabodies as therapeutic agents. *Methods* 34, 163-170.
- Kopydlowski, K.M., Salkowski, C.A., Cody, M.J., van Rooijen, N., Major, J., Hamilton, T.A., and Vogel, S.N. (1999). Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol* 163, 1537-1544.
- Kotenko, S.V., Krause, C.D., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Wu, W., and Pestka, S. (1997). Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* 16, 5894-5903.
- Kowolik, C.M., Topp, M.S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., Smith, D.D., Forman, S.J., Jensen, M.C., and Cooper, L.J. (2006). CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res* 66, 10995-11004.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1988). The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462-464.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.
- Kundu, N., Beaty, T.L., Jackson, M.J., and Fulton, A.M. (1996). Antimetastatic and antitumor activities of interleukin 10 in a murine model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 88, 536-541.
- Kurte, M., Lopez, M., Aguirre, A., Escobar, A., Aguillon, J.C., Charo, J., Larsen, C.G., Kiessling, R., and Salazar-Onfray, F. (2004). A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells. *J Immunol* 173, 1731-1737.
- Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9, 495-502.
- Lanier, L.L., Corliss, B., and Phillips, J.H. (1997). Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol Rev* 155, 145-154.
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., and Phillips, J.H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136, 4480-4486.
- Lee, D.W., Kochenderfer, J.N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y.K., Delbrook, C., Feldman, S.A., Fry, T.J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N.N., *et al.* (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 385, 517-528.
- Levine, B.L., Miskin, J., Wonnacott, K., and Keir, C. (2017). Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 4, 92-101.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal Malefyt, R., and Roncarolo, M.G. (2001). IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 166, 5530-5539.
- Levy, Y., and Brouet, J.C. (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest* 93, 424-428.
- Lewis, M.J., and Pelham, H.R. (1992). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-364.
- Li, M., Muller, J., Xu, F., Hearing, V.J., and Gorelik, E. (1996). Inhibition of melanoma-associated antigen expression and ecotropic retrovirus production in B16BL6 melanoma cells transfected with major histocompatibility complex class I genes. *Cancer Res* 56, 4464-4474.
- Lieber, M.R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283, 1-5.
- Lin, T.J., and Befus, A.D. (1997). Differential regulation of mast cell function by IL-10 and stem cell factor. *J Immunol* 159, 4015-4023.
- Liu, Y., Wei, S.H., Ho, A.S., de Waal Malefyt, R., and Moore, K.W. (1994). Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 152, 1821-1829.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 162, 1745-1759.
- Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-244.
- Ljunggren, H.G., and Malmberg, K.J. (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 7, 329-339.
- Llorente, L., Richaud-Patin, Y., Garcia-Padilla, C., Claret, E., Jakez-Ocampo, J., Cardiel, M.H., Alcocer-Varela, J., Grangeot-Keros, L., Alarcon-Segovia, D., Wijdenes, J., *et al.* (2000). Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43, 1790-1800.
- Long, A.H., Haso, W.M., Shern, J.F., Wanhainen, K.M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J.P., Walker, A.J., Kohler, M.E., Venkateshwara, V.R., *et al.* (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 21, 581-590.
- Louis, C.U., Savoldo, B., Dotti, G., Pule, M., Yvon, E., Myers, G.D., Rossig, C., Russell, H.V., Diouf, O., Liu, E., *et al.* (2011). Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 118, 6050-6056.
- Lozzio, C.B., and Lozzio, B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.
- Luevano, M., Madrigal, A., and Saudemont, A. (2012). Generation of natural killer cells from hematopoietic stem cells in vitro for immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 9, 310-320.
- Lutsiak, M.E., Semnani, R.T., De Pascalis, R., Kashmiri, S.V., Schlom, J., and Sabzevari, H. (2005). Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 105, 2862-2868.
- Ma, C.S., Nichols, K.E., and Tangye, S.G. (2007). Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* 25, 337-379.
- MacNeil, I.A., Suda, T., Moore, K.W., Mosmann, T.R., and Zlotnik, A. (1990). IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol* 145, 4167-4173.
- Magee, M.S., and Snook, A.E. (2014). Challenges to chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for cancer. *Discov Med* 18, 265-271.
- Mahrus, S., and Craik, C.S. (2005). Selective chemical functional probes of granzymes A and B reveal granzyme B is a major effector of natural killer cell-mediated lysis of target cells. *Chem Biol* 12, 567-577.
- Maki, G., Klingemann, H.G., Martinson, J.A., and Tam, Y.K. (2001). Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 369-383.
- Maki, G., Tam, Y.K., Berkahn, L., and Klingemann, H.G. (2003). Ex vivo purging with NK-92 prior to autografting for chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 31, 1119-1125.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
- Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 22, 231-237.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5, 1260-1265.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6, 13.

- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177, 7303-7311.
- Masood, R., Zhang, Y., Bond, M.W., Scadden, D.T., Moudgil, T., Law, R.E., Kaplan, M.H., Jung, B., Espina, B.M., Lunardi-Iskandar, Y., *et al.* (1995). Interleukin-10 is an autocrine growth factor for acquired immunodeficiency syndrome-related B-cell lymphoma. *Blood* 85, 3423-3430.
- Maude, S.L., Frey, N., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., Bunin, N.J., Chew, A., Gonzalez, V.E., Zheng, Z., Lacey, S.F., *et al.* (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 371, 1507-1517.
- Mazzon, C., and Viola, A. (2007). From tango to quadrilla: current views of the immunological synapse. *Cell Adh Migr* 1, 7-12.
- McVicar, D.W., and Burshtyn, D.N. (2001). Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49. *Sci STKE* 2001, re1.
- Mehrotra, P.T., Donnelly, R.P., Wong, S., Kanegane, H., Geremew, A., Mostowski, H.S., Furuke, K., Siegel, J.P., and Bloom, E.T. (1998). Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J Immunol* 160, 2637-2644.
- Menck, K., Behme, D., Pantke, M., Reiling, N., Binder, C., Pukrop, T., and Klemm, F. (2014). Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated cell culture bags. *J Vis Exp*, e51554.
- Michel, T., Hentges, F., and Zimmer, J. (2012). Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Front Immunol* 3, 403.
- Miller, J.S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S.A., Yun, G.H., Fautsch, S.K., McKenna, D., Le, C., Defor, T.E., Burns, L.J., *et al.* (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105, 3051-3057.
- Mimura, K., Teh, J.L., Okayama, H., Shiraishi, K., Kua, L.F., Koh, V., Smoot, D.T., Ashktorab, H., Oike, T., Suzuki, Y., *et al.* (2018). PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Sci* 109, 43-53.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27, 16-25.
- Mittal, S.K., and Roche, P.A. (2015). Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr Opin Immunol* 34, 22-27.
- Mocellin, S., Marincola, F., Rossi, C.R., Nitti, D., and Lise, M. (2004a). The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 61-76.
- Mocellin, S., Panelli, M., Wang, E., Rossi, C.R., Pilati, P., Nitti, D., Lise, M., and Marincola, F.M. (2004b). IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes Immun* 5, 621-630.
- Mocellin, S., Panelli, M.C., Wang, E., Nagorsen, D., and Marincola, F.M. (2003). The dual role of IL-10. *Trends Immunol* 24, 36-43.
- Mok, S., Koya, R.C., Tsui, C., Xu, J., Robert, L., Wu, L., Graeber, T., West, B.L., Bollag, G., and Ribas, A. (2014). Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy. *Cancer Res* 74, 153-161.
- Moon, J.M., Kim, G.Y., and Rhim, H. (2012). A new idea for simple and rapid monitoring of gene expression: requirement of nucleotide sequences encoding an N-terminal HA tag in the T7 promoter-driven expression in *E. coli*. *Biotechnol Lett* 34, 1841-1846.
- Moore, C.B., Guthrie, E.H., Huang, M.T., and Taxman, D.J. (2010). Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* 629, 141-158.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.

- Moore, K.W., Vieira, P., Fiorentino, D.F., Trounstein, M.L., Khan, T.A., and Mosmann, T.R. (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* **248**, 1230-1234.
- Morel, A.S., Quarantino, S., Douek, D.C., and Londei, M. (1997). Split activity of interleukin-10 on antigen capture and antigen presentation by human dendritic cells: definition of a maturative step. *Eur J Immunol* **27**, 26-34.
- Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M., and Rosenberg, S.A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* **18**, 843-851.
- Moritz, D., and Groner, B. (1995). A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther* **2**, 539-546.
- Morris, E.C., Bendle, G.M., and Stauss, H.J. (2003). Prospects for immunotherapy of malignant disease. *Clin Exp Immunol* **131**, 1-7.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-969.
- Muller, N., Hartmann, C., Genssler, S., Koch, J., Kinner, A., Grez, M., and Wels, W.S. (2014). A bispecific transmembrane antibody simultaneously targeting intra- and extracellular epitopes of the epidermal growth factor receptor inhibits receptor activation and tumor cell growth. *Int J Cancer* **134**, 2547-2559.
- Mumm, J.B., Emmerich, J., Zhang, X., Chan, I., Wu, L., Mauze, S., Blaisdell, S., Basham, B., Dai, J., Grein, J., *et al.* (2011). IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell* **20**, 781-796.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. (2012). *Janeway's immunobiology*, 8th edn (New York: Garland Science).
- Murray, P.J. (2006). Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 379-386.
- Murray, P.J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* **178**, 2623-2629.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723-737.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P., *et al.* (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**, 5998-6004.
- Nagasaki, E., Takahara, A., Koido, S., Sagawa, Y., Aiba, K., Tajiri, H., Yagita, H., and Homma, S. (2010). Combined treatment with dendritic cells and 5-fluorouracil elicits augmented NK cell-mediated antitumor activity through the tumor necrosis factor- α pathway. *J Immunother* **33**, 467-474.
- Naing, A., Infante, J.R., Wong, D.J.L., Korn, W.M., Aljumaily, R., Papadopoulos, K.P., Autio, K.A., Pant, S., Bauer, T.M., Drakaki, A., *et al.* (2017). Efficacy and safety of pegylated human IL-10 (AM0010) in combination with an anti-PD-1 in renal cell cancer. *Journal of Clinical Oncology* **35**, 4567-4567.
- Naing, A., Papadopoulos, K.P., Autio, K.A., Ott, P.A., Patel, M.R., Wong, D.J., Falchook, G.S., Pant, S., Whiteside, M., Rasco, D.R., *et al.* (2016). Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* **34**, 3562-3569.
- Nakajima, H., Gleich, G.J., and Kita, H. (1996). Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils. *J Immunol* **156**, 4859-4866.
- Nedvetzki, S., Sowinski, S., Eagle, R.A., Harris, J., Vely, F., Pende, D., Trowsdale, J., Vivier, E., Gordon, S., and Davis, D.M. (2007). Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* **109**, 3776-3785.
- Ni, J., Miller, M., Stojanovic, A., Garbi, N., and Cerwenka, A. (2012). Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* **209**, 2351-2365.

- Ni, Z., Knorr, D.A., Clouser, C.L., Hexum, M.K., Southern, P., Mansky, L.M., Park, I.H., and Kaufman, D.S. (2011). Human pluripotent stem cells produce natural killer cells that mediate anti-HIV-1 activity by utilizing diverse cellular mechanisms. *J Virol* 85, 43-50.
- Nowakowska, P., Romanski, A., Miller, N., Odendahl, M., Bonig, H., Zhang, C., Seifried, E., Wels, W.S., and Tonn, T. (2018). Clinical grade manufacturing of genetically modified, CAR-expressing NK-92 cells for the treatment of ErbB2-positive malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 67, 25-38.
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 15, 160-171.
- O'Rourke, D.M., Nasrallah, M.P., Desai, A., Melenhorst, J.J., Mansfield, K., Morrisette, J.J.D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., *et al.* (2017). A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 9.
- O'Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., Uppaluri, R., Andrews, D.M., Ngiew, S.F., Teng, M.W., *et al.* (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J Exp Med* 209, 1869-1882.
- Ocuin, L.M., Bamboat, Z.M., Balachandran, V.P., Cavnar, M.J., Obaid, H., Plitas, G., and DeMatteo, R.P. (2011). Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *J Leukoc Biol* 89, 423-432.
- Oelsner, S., Friede, M.E., Zhang, C., Wagner, J., Badura, S., Bader, P., Ullrich, E., Ottmann, O.G., Klingemann, H., Tonn, T., *et al.* (2017). Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma. *Cytotherapy* 19, 235-249.
- Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S., and Miyazaki, S. (1996). Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 157, 2909-2915.
- Osowski, C.M., and Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol* 490, 71-92.
- Overwijk, W.W., and Restifo, N.P. (2001). B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol Chapter 20*, Unit 20 21.
- Pace, J.L., Russell, S.W., Schreiber, R.D., Altman, A., and Katz, D.H. (1983). Macrophage activation: priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3782-3786.
- Palucka, K.A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., and Gluckman, J.C. (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 160, 4587-4595.
- Papadopoulos, K.P., Naing, A., Infante, J.R., Autio, K.A., Ott, P.A., Wong, D.J.L., Falchook, G.S., Patel, M.R., Pant, S., Whiteside, M., *et al.* (2016). Anti-tumor activity of PEGylated human IL-10 (AM0010) in patients with pancreatic or colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 34, 3082-3082.
- Papamichail, M., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., and Baxevanis, C.N. (2004). Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother* 53, 176-186.
- Park, J.Y., Lee, S.H., Yoon, S.R., Park, Y.J., Jung, H., Kim, T.D., and Choi, I. (2011). IL-15-induced IL-10 increases the cytolytic activity of human natural killer cells. *Mol Cells* 32, 265-272.
- Patel, S.D., Moskalenko, M., Smith, D., Maske, B., Finer, M.H., and McArthur, J.G. (1999). Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function. *Gene Ther* 6, 412-419.
- Patidar, M., Yadav, N., and Dalai, S.K. (2016). Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 31, 49-59.
- Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K., and Kershaw, M.H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* 89, 216-224.
- Pegram, H.J., Jackson, J.T., Smyth, M.J., Kershaw, M.H., and Darcy, P.K. (2008). Adoptive transfer of gene-modified primary NK cells can specifically inhibit tumor progression in vivo. *J Immunol* 181, 3449-3455.
- Pegram, H.J., Lee, J.C., Hayman, E.G., Imperato, G.H., Tedder, T.F., Sadelain, M., and Brentjens, R.J. (2012). Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood* 119, 4133-4141.

- Peguet-Navarro, J., Moulon, C., Caux, C., Dalbiez-Gauthier, C., Banchereau, J., and Schmitt, D. (1994). Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 24, 884-891.
- Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Dondero, A., Lazzeri, E., Lasagni, L., Martini, S., Rivera, P., *et al.* (2006). Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 107, 2030-2036.
- Peng, R., Lin, G., and Li, J. (2016). Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J* 283, 1218-1231.
- Peters, J.H., Ruhl, S., and Friedrichs, D. (1987). Veiled accessory cells deduced from monocytes. *Immunobiology* 176, 154-166.
- Peters, J.H., Xu, H., Ruppert, J., Ostermeier, D., Friedrichs, D., and Gieseler, R.K. (1993). Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv Exp Med Biol* 329, 275-280.
- Petersson, M., Charo, J., Salazar-Onfray, F., Noffz, G., Mohaupt, M., Qin, Z., Klein, G., Blankenstein, T., and Kiessling, R. (1998). Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. *J Immunol* 161, 2099-2105.
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N.M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195, 335-341.
- Pistoia, V. (1997). Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* 18, 343-350.
- Poli, A., Michel, T., Theresine, M., Andres, E., Hentges, F., and Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126, 458-465.
- Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C.H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365, 725-733.
- Pule, M.A., Savoldo, B., Myers, G.D., Rossig, C., Russell, H.V., Dotti, G., Huls, M.H., Liu, E., Gee, A.P., Mei, Z., *et al.* (2008). Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 14, 1264-1270.
- Pule, M.A., Straathof, K.C., Dotti, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M., and Brenner, M.K. (2005). A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther* 12, 933-941.
- Qian, B.Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475, 222-225.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.
- Quatromoni, J.G., and Eruslanov, E. (2012). Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res* 4, 376-389.
- Rafiq, K., Charitidou, L., Bullens, D.M., Kasran, A., Lorre, K., Ceuppens, J., and van Gool, S.W. (2001). Regulation of the IL-10 production by human T cells. *Scand J Immunol* 53, 139-147.
- Rahimi, A.A., Gee, K., Mishra, S., Lim, W., and Kumar, A. (2005). STAT-1 mediates the stimulatory effect of IL-10 on CD14 expression in human monocytic cells. *J Immunol* 174, 7823-7832.
- Rao, D.D., Vorhies, J.S., Senzer, N., and Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 746-759.
- Raulet, D.H., Vance, R.E., and McMahon, C.W. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 19, 291-330.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476-483.
- Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., and Wentzensen, N. (2009). A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1535-1544.

- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., and Schuler, G. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 196, 137-151.
- Rosenberg, S. (1985). Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* 75, 595-603.
- Rosenberg, S.A. (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10, 281-287.
- Rosenberg, S.A. (2000). Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *Cancer J Sci Am* 6 Suppl 1, S2-7.
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., Rubin, J.T., *et al.* (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316, 889-897.
- Rossig, C., Bollard, C.M., Nuchtern, J.G., Merchant, D.A., and Brenner, M.K. (2001). Targeting of G(D2)-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes. *Int J Cancer* 94, 228-236.
- Roszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015, 816460.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D.H., Kastelein, R., Moore, K.W., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1890-1893.
- Rousset, F., Peyrol, S., Garcia, E., Vezzio, N., Andujar, M., Grimaud, J.A., and Banchereau, J. (1995). Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. *Int Immunol* 7, 1243-1253.
- Ruddon, R.W. (2007). *Cancer biology*, 4th edn (Oxford ; New York: Oxford University Press).
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F., and Velardi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94, 333-339.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., *et al.* (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097-2100.
- Ruppert, J., Schutt, C., Ostermeier, D., and Peters, J.H. (1993). Down-regulation and release of CD14 on human monocytes by IL-4 depends on the presence of serum or GM-CSF. *Adv Exp Med Biol* 329, 281-286.
- Saeland, S., Duvert, V., Moreau, I., and Banchereau, J. (1993). Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation. *J Exp Med* 178, 113-120.
- Sahm, C., Schonfeld, K., and Wels, W.S. (2012). Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunol Immunother* 61, 1451-1461.
- Sakuma, T., Barry, M.A., and Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* 443, 603-618.
- Saraiva, M., Christensen, J.R., Veldhoen, M., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (2009). Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* 31, 209-219.
- Saraiva, M., and O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10, 170-181.
- Sasawatari, S., Tadaki, T., Isogai, M., Takahara, M., Nieda, M., and Kakimi, K. (2006). Efficient priming and expansion of antigen-specific CD8+ T cells by a novel cell-based artificial APC. *Immunol Cell Biol* 84, 512-521.
- Sato, T., Terai, M., Tamura, Y., Alexeev, V., Mastrangelo, M.J., and Selvan, S.R. (2011). Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res* 51, 170-182.

- Savina, A., and Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219, 143-156.
- Schaefer, K.A., Wu, W.H., Colgan, D.F., Tsang, S.H., Bassuk, A.G., and Mahajan, V.B. (2017). Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo. *Nat Methods* 14, 547-548.
- Schonfeld, K., Sahm, C., Zhang, C., Naundorf, S., Brendel, C., Odendahl, M., Nowakowska, P., Bonig, H., Kohl, U., Kloess, S., *et al.* (2015). Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther* 23, 330-338.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189.
- Schulz, U., Kreutz, M., Multhoff, G., Stoelcker, B., Kohler, M., Andreesen, R., and Holler, E. (2010). Interleukin-10 promotes NK cell killing of autologous macrophages by stimulating expression of NKG2D ligands. *Scand J Immunol* 72, 319-331.
- Seliger, B., and Pfizenmaier, K. (1989). Post-transcriptional downregulation of MHC class I expression in oncogene-transformed cells is reverted by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunogenet* 16, 315-320.
- Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T., and Huber, C. (2001). Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 61, 1095-1099.
- Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., and Sartor, R.B. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 66, 5224-5231.
- Serrano, A.E., Menares-Castillo, E., Garrido-Tapia, M., Ribeiro, C.H., Hernandez, C.J., Mendoza-Naranjo, A., Gatica-Andrades, M., Valenzuela-Diaz, R., Zuniga, R., Lopez, M.N., *et al.* (2011). Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunol Cell Biol* 89, 447-457.
- Shaki-Loewenstein, S., Zfania, R., Hyland, S., Wels, W.S., and Benhar, I. (2005). A universal strategy for stable intracellular antibodies. *J Immunol Methods* 303, 19-39.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Siewe, L., Bollati-Fogolin, M., Wickenhauser, C., Krieg, T., Muller, W., and Roers, A. (2006). Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *Eur J Immunol* 36, 3248-3255.
- Siomi, H., and Siomi, M.C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457, 396-404.
- Sledz, C.A., and Williams, B.R. (2004). RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans* 32, 952-956.
- Smith, L.K., Boukhaled, G.M., Condotta, S.A., Mazouz, S., Guthmiller, J.J., Vijay, R., Butler, N.S., Bruneau, J., Shoukry, N.H., Krawczyk, C.M., *et al.* (2018). Interleukin-10 Directly Inhibits CD8(+) T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity* 48, 299-312 e295.
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2001a). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2, 293-299.
- Smyth, M.J., Kelly, J.M., Sutton, V.R., Davis, J.E., Browne, K.A., Sayers, T.J., and Trapani, J.A. (2001b). Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *J Leukoc Biol* 70, 18-29.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86, 1065-1073.
- Sozzani, S., Ghezzi, S., Iannolo, G., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Sica, A., Locati, M., Mackay, C., Wells, T.N., *et al.* (1998). Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J Exp Med* 187, 439-444.

- Spanholtz, J., Tordoir, M., Eissens, D., Preijers, F., van der Meer, A., Joosten, I., Schaap, N., de Witte, T.M., and Dolstra, H. (2010). High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS One* 5, e9221.
- Sredni, B., Weil, M., Khomenok, G., Lebenthal, I., Teitz, S., Mardor, Y., Ram, Z., Orenstein, A., Kershenovich, A., Michowiz, S., *et al.* (2004). Ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o')tellurate (AS101) sensitizes tumors to chemotherapy by inhibiting the tumor interleukin 10 autocrine loop. *Cancer Res* 64, 1843-1852.
- Statistisches Bundesamt (2017). Pressemitteilung Nr. 022 vom 19.01.2017, unter https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/01/PD17_022_232.html [Stand: 03.07.2018, 18 Uhr].
- Suan, D., Sundling, C., and Brink, R. (2017). Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Curr Opin Immunol* 45, 97-102.
- Suck, G., Oei, V.Y., Linn, Y.C., Ho, S.H., Chu, S., Choong, A., Niam, M., and Koh, M.B. (2011). Interleukin-15 supports generation of highly potent clinical-grade natural killer cells in long-term cultures for targeting hematological malignancies. *Exp Hematol* 39, 904-914.
- Sun, Z., Fourcade, J., Pagliano, O., Chauvin, J.M., Sander, C., Kirkwood, J.M., and Zarour, H.M. (2015). IL10 and PD-1 Cooperate to Limit the Activity of Tumor-Specific CD8+ T Cells. *Cancer Res* 75, 1635-1644.
- Sung, W.W., Wang, Y.C., Lin, P.L., Cheng, Y.W., Chen, C.Y., Wu, T.C., and Lee, H. (2013). IL-10 promotes tumor aggressiveness via upregulation of CIP2A transcription in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 19, 4092-4103.
- Sutherland, C.L., Chalupny, N.J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., and Cosman, D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 168, 671-679.
- Sutlu, T., Nystrom, S., Gilljam, M., Stellan, B., Applequist, S.E., and Alici, E. (2012). Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 23, 1090-1100.
- Tam, Y.K., Martinson, J.A., Doligosa, K., and Klingemann, H.G. (2003). Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy. *Cytotherapy* 5, 259-272.
- Tam, Y.K., Miyagawa, B., Ho, V.C., and Klingemann, H.G. (1999). Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92. *J Hematother* 8, 281-290.
- te Velde, A.A., de Waal Malefijt, R., Huijbens, R.J., de Vries, J.E., and Figdor, C.G. (1992). IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J Immunol* 149, 4048-4052.
- Terai, M., Tamura, Y., Alexeev, V., Ohtsuka, E., Berd, D., Mastrangelo, M.J., and Sato, T. (2009). Human interleukin 10 receptor 1/IgG1-Fc fusion proteins: immunoadhesins for human IL-10 with therapeutic potential. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1307-1317.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol* 12, 770-777.
- Thiery, J., Keefe, D., Saffarian, S., Martinvalet, D., Walch, M., Boucrot, E., Kirchhausen, T., and Lieberman, J. (2010). Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* 115, 1582-1593.
- Thivierge, M., Parent, J.L., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (1999). Modulation of formyl peptide receptor expression by IL-10 in human monocytes and neutrophils. *J Immunol* 162, 3590-3595.
- Tomasello, E., Blery, M., Vely, F., and Vivier, E. (2000). Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol* 12, 139-147.

- Tonn, T., Becker, S., Esser, R., Schwabe, D., and Seifried, E. (2001). Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 535-544.
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H.G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Suttorp, M., Seifried, E., Ottmann, O.G., and Bug, G. (2013). Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* 15, 1563-1570.
- Torelli, G.F., Guarini, A., Maggio, R., Alfieri, C., Vitale, A., and Foa, R. (2005). Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission. *Haematologica* 90, 785-792.
- Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.
- Turner, M., and Billadeau, D.D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2, 476-486.
- Turowski, T.W., and Tollervey, D. (2016). Transcription by RNA polymerase III: insights into mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans* 44, 1367-1375.
- Turtle, C.J., Hanafi, L.A., Berger, C., Gooley, T.A., Cherian, S., Hudecek, M., Sommermeyer, D., Melville, K., Pender, B., Budiarto, T.M., *et al.* (2016a). CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* 126, 2123-2138.
- Turtle, C.J., Hanafi, L.A., Berger, C., Hudecek, M., Pender, B., Robinson, E., Hawkins, R., Chaney, C., Cherian, S., Chen, X., *et al.* (2016b). Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med* 8, 355ra116.
- Urosevic, M., and Dummer, R. (2003). HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message. *Semin Cancer Biol* 13, 337-342.
- Van Elssen, C.H., Oth, T., Germeraad, W.T., Bos, G.M., and Vanderlocht, J. (2014). Natural killer cells: the secret weapon in dendritic cell vaccination strategies. *Clin Cancer Res* 20, 1095-1103.
- Vegh, Z., Wang, P., Vanky, F., and Klein, E. (1993). Increased expression of MHC class I molecules on human cells after short time IFN-gamma treatment. *Mol Immunol* 30, 849-854.
- Vicari, A.P., Chiodoni, C., Vaure, C., Ait-Yahia, S., Dercamp, C., Matsos, F., Reynard, O., Taverne, C., Merle, P., Colombo, M.P., *et al.* (2002). Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J Exp Med* 196, 541-549.
- Vieira, P., de Waal-Malefyt, R., Dang, M.N., Johnson, K.E., Kastelein, R., Fiorentino, D.F., deVries, J.E., Roncarolo, M.G., Mosmann, T.R., and Moore, K.W. (1991). Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1172-1176.
- Vigna, E., and Naldini, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2, 308-316.
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Arico, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2005a). NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106, 566-571.
- Vitale, M., Pelusi, G., Taroni, B., Gobbi, G., Micheloni, C., Rezzani, R., Donato, F., Wang, X., and Ferrone, S. (2005b). HLA class I antigen down-regulation in primary ovary carcinoma lesions: association with disease stage. *Clin Cancer Res* 11, 67-72.
- Wagner, J., Pfannenstiel, V., Waldmann, A., Bergs, J.W.J., Brill, B., Huenecke, S., Klingebiel, T., Rodel, F., Buchholz, C.J., Wels, W.S., *et al.* (2017). A Two-Phase Expansion Protocol Combining Interleukin (IL)-15 and IL-21 Improves Natural Killer Cell Proliferation and Cytotoxicity against Rhabdomyosarcoma. *Front Immunol* 8, 676.
- Walsh, N.C., Kenney, L.L., Jangalwe, S., Aryee, K.E., Greiner, D.L., Brehm, M.A., and Shultz, L.D. (2017). Humanized Mouse Models of Clinical Disease. *Annu Rev Pathol* 12, 187-215.
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106, 2252-2258.

- Wang, C.M., Wu, Z.Q., Wang, Y., Guo, Y.L., Dai, H.R., Wang, X.H., Li, X., Zhang, Y.J., Zhang, W.Y., Chen, M.X., *et al.* (2017). Autologous T Cells Expressing CD30 Chimeric Antigen Receptors for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: An Open-Label Phase I Trial. *Clin Cancer Res* 23, 1156-1166.
- Watzl, C., and Long, E.O. (2010). Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells. *Curr Protoc Immunol Chapter 11*, Unit 11 19B.
- Weiner, G.J. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer* 15, 361-370.
- Weiss, J.M., Subleski, J.J., Wigginton, J.M., and Wiltrott, R.H. (2007). Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opin Biol Ther* 7, 1705-1721.
- Willems, F., Marchant, A., Delville, J.P., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., de Boer, M., and Goldman, M. (1994). Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 24, 1007-1009.
- Williams, B.A., Law, A.D., Routy, B., denHollander, N., Gupta, V., Wang, X.H., Chaboureaud, A., Viswanathan, S., and Keating, A. (2017). A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. *Oncotarget*.
- Williams, C.B., Yeh, E.S., and Soloff, A.C. (2016). Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer* 2.
- Williams, L., Bradley, L., Smith, A., and Foxwell, B. (2004a). Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 172, 567-576.
- Williams, L.M., Ricchetti, G., Sarma, U., Smallie, T., and Foxwell, B.M. (2004b). Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* 113, 281-292.
- Winter, G., and Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature* 349, 293-299.
- Woll, P.S., Grzywacz, B., Tian, X., Marcus, R.K., Knorr, D.A., Verneris, M.R., and Kaufman, D.S. (2009). Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo antitumor activity. *Blood* 113, 6094-6101.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-732.
- Wucherpfennig, K.W., Gagnon, E., Call, M.J., Huseby, E.S., and Call, M.E. (2010). Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a005140.
- Yan, Y., Steinherz, P., Klingemann, H.G., Dennig, D., Childs, B.H., McGuirk, J., and O'Reilly, R.J. (1998). Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res* 4, 2859-2868.
- Yip, A., and Webster, R.M. (2018). The market for chimeric antigen receptor T cell therapies. *Nat Rev Drug Discov*.
- Yoon, S.I., Logsdon, N.J., Sheikh, F., Donnelly, R.P., and Walter, M.R. (2006). Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol Chem* 281, 35088-35096.
- Yue, F.Y., Dummer, R., Geertsens, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolio, S., and Burg, G. (1997). Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 71, 630-637.
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., and Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188, 2375-2380.
- Zdanov, A. (2010). Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 325-330.

- Zdanov, A., Schalk-Hihi, C., Gustchina, A., Tsang, M., Weatherbee, J., and Wlodawer, A. (1995). Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure* 3, 591-601.
- Zeller, J.C., Panoskaltsis-Mortari, A., Murphy, W.J., Ruscetti, F.W., Narula, S., Roncarolo, M.G., and Blazar, B.R. (1999). Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 163, 3684-3691.
- Zhang, C., Burger, M.C., Jennewein, L., Genssler, S., Schonfeld, K., Zeiner, P., Hattingen, E., Harter, P.N., Mittelbronn, M., Tonn, T., *et al.* (2016). ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *J Natl Cancer Inst* 108.
- Zhang, C., Helmsing, S., Zagrebelsky, M., Schirrmann, T., Marschall, A.L., Schungel, M., Korte, M., Hust, M., and Dubel, S. (2012). Suppression of p75 neurotrophin receptor surface expression with intrabodies influences Bcl-xL mRNA expression and neurite outgrowth in PC12 cells. *PLoS One* 7, e30684.
- Zhang, C., Oberoi, P., Oelsner, S., Waldmann, A., Lindner, A., Tonn, T., and Wels, W.S. (2017). Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity. *Front Immunol* 8, 533.
- Zhao, Z., Condomines, M., van der Stegen, S.J., Perna, F., Kloss, C.C., Gunset, G., Plotkin, J., and Sadelain, M. (2015). Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell* 28, 415-428.
- Zheng, L.M., Ojcius, D.M., Garaud, F., Roth, C., Maxwell, E., Li, Z., Rong, H., Chen, J., Wang, X.Y., Catino, J.J., *et al.* (1996). Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *J Exp Med* 184, 579-584.
- Zhong, X.S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I., and Sadelain, M. (2010). Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther* 18, 413-420.
- Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 27, 51-177.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-875.

7 Abkürzungsverzeichnis

α	anti-	G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
Abb.	Abbildung	GEF	<i>guanosine triphosphate exchange factor</i>
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
AF	Alexa Fluor	GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
AICD	<i>activation-induced cell death</i>	GMP	<i>good manufacturing practice</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie	GrA/B	Granzym A/B
AML	Akute myeloische Leukämie	gRNA	<i>guide RNA</i>
APC	Allophycocyanin (Fluorochrom)	GvHD	<i>graft-versus-host disease</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>	Gy	Gray
APS	Ammoniumpersulfat	h	Stunde
B2M	β 2-Mikroglobulin	HA	<i>human influenza hemagglutinin</i>
BiP	<i>immunoglobulin heavy-chain-binding protein</i>	hESC	<i>human embryonic stem cells</i>
bp	Basenpaar	HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
BV	Brilliant™ Violet	HSP	Hitzeschockprotein
ca.	circa	HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>	hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
Cas	CRISPR-associated	ICOS	<i>inducible costimulator domain</i>
CBA	<i>cytometric bead array</i>	IFN- γ	Interferon- γ
CD	<i>cluster of differentiation</i>	Ig	Immunglobulin
cDNA	<i>complementary DNA</i>	IL	Interleukin
CIP	<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>	ILT2	<i>Ig-like transcript 2</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie	IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
cm	Zentimeter	iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i>
CMV	Cytomegalievirus	IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	IS	Immunologische Synapse
CRP2	<i>cysteine and glycine-rich protein 2</i>	ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
CRS	<i>cytokine release syndrome</i>	ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
CSIF	<i>cytokine synthesis inhibiting factor</i>	ITSM	<i>immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>	IU	<i>international unit</i>
Ctrl	<i>control</i>	Jak1	Janus Kinase 1
CV	Calcein Violet AM	k.A.	keine Angabe
DAP10	DNAX-activation protein 10	kb	Kilobase
DC	<i>dendritic cell</i>	kDa	Kilo-Dalton
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser	KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
DMSO	Dimethylsulfoxid	LB	Luria Burtani
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LILR	<i>leukocyte immunoglobulin-like receptors</i>
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat	LPS	Lipopolysaccharid
DPBS	Dulbecco's <i>phosphate-buffered saline</i>	M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
E/T	Effektor/Target	mA	Milliampère
EBV	Epstein-Barr-Virus	MDM	<i>monocyte-derived macrophages</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cell</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	mg	Milligramm
EGFP	<i>enhanced GFP</i>	μ g	Mikrogramm
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
EGFR-III	<i>epidermal growth factor receptor variant III</i>	Min	Minute
eIF2 α	Eukaryotischer Initiationsfaktor 2-alpha	MICA/B	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A/B</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein-1α</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>	ml	Milliliter
ER	Endoplasmatisches Retikulum	μ l	Mikroliter
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>	μ m	Mikrometer
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>	μ M	Mikromolar
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	mM	Millimolar
FcR γ	Fc-Rezeptor γ	MoDC	<i>monocyte-derived dendritic cell</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>	mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i>
G	Erdbeschleunigung	ng	Nanogramm
		NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
		NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
		nm	Nanometer

nM	Nanomolar	UniCAR	<i>universal chimeric antigen receptor</i>
ns	Nicht signifikant	UPR	<i>unfolded protein response</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i>	UV	Ultraviolett
PAA	Polyacrylamid	V	Volt
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>	v/v	<i>volume/volume percent</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
PD-L1	<i>programmed cell death-ligand 1</i>	V _H	<i>variable heavy chain</i>
PE	Phycoerythrin	V _L	<i>variable light chain</i>
PEI	Polyethylenimin	VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus protein-G</i>
pelF2α	Phospho-eIF2α	w/v	<i>weight/volume percent</i>
PERK	<i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>	ZAP-70	<i>zeta-chain-associated protein kinase 70</i>
PGE2	Prostaglandin E2		
PI	Propidiumiodid		
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase		
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat		
PLC-γ	Phospholipase C-γ		
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat		
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>		
pSTAT3	Phospho-STAT3		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
qPCR	Quantitative PCR		
Rα	Rezeptor-α		
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	rounds per minute		
RPMI	Roswell Park Memorial Institute		
RT	Raumtemperatur		
s	Sekunde		
scFv	<i>single chain fragment variable</i>		
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>		
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>		
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>		
SEM	<i>standard error of the mean</i>		
SFFV	<i>spleen focus-forming virus</i>		
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>		
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>		
SP	Signalpeptid		
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>		
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>		
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen		
TBST	<i>tris-buffered saline-TWEEN 20</i>		
TCR	<i>T cell receptor</i>		
TEMED	Tetramethylethylendiamin		
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>		
tGFP	<i>turbo GFP</i>		
TIMP-1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>		
TLR	Toll-like-Rezeptor		
TLS	Tumolyse-Syndrom		
TM	Transmembran		
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin		
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>		
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>		
Treg	<i>regulatory T cell</i>		
TRUCK	<i>T cell redirected for universal cytokine-mediated killing</i>		
TSA	Tumor-spezifisches Antigen		
Tyr	Tyrosin		
U	<i>enzyme Unit</i>		
u.a.	unter anderem		
ULBP	<i>UL-16 binding protein</i>		

Publikationen

Veröffentlichungen

Wagner, J., Pfannenstiel, V., Waldmann, A., Bergs, J.W.J., Brill, B., Huenecke, S., Klingebiel, T., Rodel, F., Buchholz, C.J., Wels, W.S. Bader, P., Ullrich, E. (2017). A Two-Phase Expansion Protocol Combining Interleukin (IL)-15 and IL-21 Improves Natural Killer Cell Proliferation and Cytotoxicity against Rhabdomyosarcoma. *Front Immunol* 8, 676.

Zhang, C., Oberoi, P., Oelsner, S., Waldmann, A., Lindner, A., Tonn, T., and Wels, W.S. (2017). Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity. *Front Immunol* 8, 533.

Ausgewählte Posterpräsentationen

Anja Waldmann, Congcong Zhang, Nina Müller, Stefan Stein, Manuel Kaulich, Aline Lindner, Winfried S. Wels (2018)

"Inhibition of IL-10 secretion in CAR-engineered NK cells modulates polarization of bystander macrophages and enhances dendritic cell maturation"

17th Meeting of the Society for Natural Immunity, San Antonio, USA

Congcong Zhang, Michael C. Burger, Paulina Nowakowska, Anja Waldmann, Annette Romanski, Torsten Tonn, Joachim P. Steinbach, Winfried S. Wels (2018)

"Preclinical characterization of an off-the-shelf chimeric antigen receptor-engineered NK cell therapeutic for adoptive cancer immunotherapy"

17th Meeting of the Society for Natural Immunity, San Antonio, USA

Anja Waldmann, Congcong Zhang, Nina Müller, Stefan Stein, Manuel Kaulich, Aline Lindner, Winfried S. Wels (2018)

"Inhibition of IL-10 secretion in CAR-engineered NK cells modulates polarization of bystander macrophages and enhances dendritic cell maturation"

16th Annual Meeting of the Association for Cancer Immunotherapy (CIMT), Mainz

Congcong Zhang, Michael C. Burger, Anja Waldmann, Torsten Tonn, Joachim P. Steinbach, Winfried S. Wels (2017)

"Targeted NK cells display potent activity against glioblastoma and induce protective antitumor immunity"

Third CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference: Translating Science into Survival, Mainz

Congcong Zhang, Michael C. Burger, Anja Waldmann, Torsten Tonn, Joachim P. Steinbach, Winfried S. Wels (2017)

„Targeted NK cells display potent activity against glioblastoma and induce protective antitumor immunity"

Natural Killer Cell Symposium, Düsseldorf

Congcong Zhang, Michael C. Burger, Anja Waldmann, Torsten Tonn, Joachim P. Steinbach, Winfried S. Wels (2017)

"Targeted NK cells display potent activity against glioblastoma and induce protective antitumor immunity"

Cancer Immunology and Immunotherapy: Taking a Place in Mainstream Oncology, Fairmont Chateau Whistler, Kanada

Congcong Zhang, Michael C. Burger, Lukas Jennewein, Anja Waldmann, Iris Mildenerger, Michel Mittelbronn, Torsten Tonn⁶, Joachim P. Steinbach, Winfried S. Wels (2017)

"Targeted NK cells display potent activity against glioblastoma and induce protective antitumor immunity"

9th International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products, Erlangen

Congcong Zhang, Michael C. Burger, Lukas Jennewein, Anja Waldmann, Michel Mittelbronn, Torsten Tonn, Joachim P. Steinbach, Winfried S. Wels (2016)

„Targeted NK Cells Display Potent Activity Against Glioblastoma and Induce Protective Antitumor Immunity“

16th Meeting of the Society for Natural Immunity, Taormina, Italien

Patentanträge

Wels, W.S., Waldmann, A., Zhang, C., Kaulich, M. "Methods and compounds for improved immune cell therapy", Europäische Patentanmeldung 17197125.2, eingereicht am 18. Oktober 2017.

Danksagung

Hilfsbereitschaft ist nichts Selbstverständliches, daher möchte ich mich bei allen von Herzen bedanken, die mir während der Dissertation zur Seite standen und mich unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Winfried Wels für die Auswahl des interessanten Forschungsprojektes, für die konstruktive Kritik und die vielen hilfreichen Anregungen, für die gewissenhafte Korrektur meiner Doktorarbeit und für das entgegengebrachte Vertrauen bei der unabhängigen Gestaltung des Projektes. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Beatrix Süß und Prof. Dr. Bodo Laube für die Übernahme der Betreuung von Seiten des Fachbereichs Biologie der TU Darmstadt.

Meinem Ko-Betreuer Dr. Stefan Stein aus dem Georg-Speyer Haus möchte ich für die hilfreichen Diskussionen, die vielen Ratschlägen und für die gute Laune recht herzlich danken.

Daneben danke ich unseren Kooperationspartnern Dr. Manuel Kaulich aus dem Institut für Biochemie der Goethe Universität für die Unterstützung bezüglich der CRISPR/Cas9-Technologie und Prof. Dr. Ralf Schubert, und insbesondere Petra Schön aus dem Pneumologisch/Immunologischen Labor am Universitätsklinikum der Goethe Universität für die Unterstützung bezüglich der Zytokinmessungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Tefik Merovci für die Unterstützung bei den Zellsortierungen, bei Herbert Kühnel für die Hilfe bei gentechnischen Formalitäten und Steffen Luft für die Bewältigung von Problemen seitens der IT.

Von Herzen danke ich allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Wels: Malena Bodden, Sabrina Genßler, Thorsten Geyer, Aline Lindner, Nina Müller, Sarah Ölsner, Pranav Oberoi, Jasmin Röder, Barbara Uherek, Congcong Zhang. Hierbei möchte ich Nina Müller und Thorsten Geyer hervorheben, die mich zu Beginn der Doktorarbeit eingearbeitet und mir alle nötigen Tipps und Tricks zur Bewältigung des Laboralltags weitergegeben haben! Außerdem danke ich Thorsten für den delikaten Honig. Daneben bedanke ich mich bei Congcong und Pranav für die fachliche Unterstützung. Barbara danke ich für die Hilfe bei den Mausexperimenten, für die unzähligen DNA-Isolierungen aus den Maxi-Kulturen und natürlich für die sportliche und seelische Vorbereitung auf den HM. Sabrina und Sarah danke ich für ihre Ratschläge, die gute Laune, kritischen Diskussionen und vor allem für ihre Freundschaft! Bei Aline, Jasmin und Malena möchte ich mich für die guten Gespräche während und neben der Arbeit bedanken.

Ich möchte mich bei allen jetzigen und ehemaligen, lieben Kollegen des Georg-Speyer-Hauses für die tolle Zeit und ihre Hilfe bedanken, darunter Stefanie Herkt, Sarah Kalusche, Madina Karimova, Heinrich Krompiec, Katja Niesel, Jasmin Yillah, Sandra Weil und Josephine Wesely. Aus der Universitätsklinik Frankfurt möchte ich Juliane Wagner für die guten Gespräche, den seelischen Balsam und ihre Freundschaft bedanken.

Der größte Dank richtet sich an meine Eltern, meine Schwester, meine restliche Familie, meine Freunde und an meinen Freund Oli für die Unterstützung, die Freiheiten, das Verständnis und für die wertvolle Zeit, die ich mit euch verbringen darf!

Lebenslauf

Name	Anja Waldmann
Geburtsdatum	15. Oktober 1988
Staatsbürgerschaft	Deutsch
Adresse	Rathenaustraße 19 63067 Offenbach
Email	anja_waldmann@outlook.de



Ausbildung

Okt 2014 - Juli 2018	Promotion im Georg-Speyer-Haus, Institut für Tumorbilogie und Experimentelle Therapie, Frankfurt, Betreuer: Prof. Dr. W. Wels
Okt 2011 - Nov 2013	Masterstudium <i>Molecular Life Science</i> an der Universität zu Lübeck (Note: 1,3) Masterarbeit: „Epigenetische Charakterisierung von Tumorstammzellen aus Glioblastomen“, Neuroonkologisches Labor der Neurochirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Campus Lübeck), Betreuer: PD Dr. rer. nat. Christina Zechel
Okt 2008 – Sep 2011	Bachelorstudium <i>Molecular Life Science</i> an der Universität zu Lübeck (Note: 2,3) Bachelorarbeit: „Verminderte Selektin E Expression in Polyposis Nasī“ Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Campus Lübeck), Betreuer: Prof. Dr. Barbara Wollenberg
1999 – 2008	Gymnasium Friderico-Francisceum zu Bad Doberan Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,5)

Praktika und Studentische Nebentätigkeiten

Dez 2012 - Feb 2013	Praktikum im Institut für Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch
Aug 2012 - Nov 2012	Praktikum im Institut für Mikrobiologie, Tumor- und Zellbiologie am Karolinska Institut Stockholm (Schweden)

Apr 2011-Okt 2011

Wissenschaftliche Hilfskraft im Labor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Campus Lübeck)

Aug 2006 - Jun 2008

Praktikum im Forschungslabor für kardialen Gewebe- und Organersatz der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universität Rostock